



Miguel Bruno de Sousa Baptista

Licenciado em Ciências da Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de novas nanopartículas magnéticas para teragnóstico

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof^a Doutora Paula Isabel Pereira Soares, DCM – FCT/UNL

Co-orientadores: Prof^a Doutora Marta Cristina Parracho Cançado Corvo, DCM –
FCT/UNL

Juri:

Presidente: Prof^a Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Vogais: Prof^a Doutora Maria Manuel Marques Araújo

Prof^a Doutora Marta Cristina Parracho Cançado Corvo

Setembro, 2017



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Desenvolvimento de novas nanopartículas magnéticas para teragnóstico

Copyright © Miguel Bruno de Sousa Baptista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras – professora Paula Soares e professora Marta Corvo, por toda a disponibilidade e profissionalismo demonstrados ao longo da realização desta dissertação. A boa disposição conjugada com um grande espírito de responsabilidade, bem como a constante vontade de alcançar mais, foram sem dúvida características que apreciei bastante e que me ajudaram imenso ao longo dos últimos meses.

Ao professor Pedro Almeida, um agradecimento especial, pelas sugestões e disponibilidade contantes, que muitos benefícios trouxeram para o desenrolar deste projeto.

Ao professor Jorge Silva, pela paciência e entrega demonstradas na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos meus colegas do laboratório do DCM – Paulinha, Ricardo Matos, Renato Martins, Catarina Chaparro e Adriano Brás – o meu muito obrigado por me aturarem pelo menos 5 dias da semana. Cada um de vocês contribui da forma que melhor sabe, mas sem dúvida que foram “peças” imprescindíveis nesta fase da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório do CENIMAT – Tiago Paiva e Gabriel Marcelinho – que para além de partilharem comigo as temperaturas extremas do laboratório, foram capazes de me acolher da melhor forma e ajudar sempre que fosse necessário.

A todos os meus amigos, dentro e fora da faculdade, que sempre me deram forças para lutar pelos meus objetivos. Deixo um especial agradecimento ao meu colega de casa Duarte Brasil e aos FF – David Melo, Gonçalo Barreto, Gonçalo Luís, Gonçalo Costa e Paulo Teixeira – não só por me darem sempre força nesta fase, mas por terem marcado a minha passagem por esta faculdade. Apareceram de repente, mas tão cedo não irão!

Queria agradecer à minha família, que embora distantes, nunca deixaram de me apoiar e de acreditar em mim. Sempre estiveram do meu lado, nos bons e maus momentos. Sem vocês nada teria sido possível.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer de forma incontestável aos meus pais e à minha mana. Vocês foram sem dúvida as pessoas que mais contribuíram para que todos os dias lutasse por algo mais. O vosso apoio incondicional e o facto de acreditarem cegamente em mim, mesmo quando nem eu acreditava, foram sem dúvida a maior das motivações.

RESUMO

Nos dias de hoje, o cancro é tomado como a doença com maior impacto social, sendo responsável por 1 em cada 7 mortes em todo o mundo. Deste modo, a extrema importância do desenvolvimento de técnicas inovadoras para o seu tratamento e diagnóstico, levou ao surgimento de um conceito que visa a interligação entre estes dois estágios, habitualmente designado por teragnóstico. Nos últimos anos, tem sido alvo de estudo a possibilidade de integrar nanopartículas de óxidos de ferro (IONPs) em diversas aplicações biomédicas, devido às suas reduzidas dimensões, elevada razão superfície/volume e magnetização.

Nesta tese de mestrado, foram sintetizadas suspensões aquosas de nanopartículas superparamagnéticas de magnetite (Fe_3O_4) com um diâmetro médio de 10 nm, pelo método de precipitação química. O objetivo foi testar a sua aplicação como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética nuclear e como técnica de tratamento através de hipertermia magnética.

Uma vez que estas partículas apresentam tendência natural para formar agregados e precipitar quando em solução aquosa, foi necessário recorrer à modificação superficial das mesmas com tensioativos biocompatíveis, para que fosse possível a sua aplicação em ambientes fisiológicos. Foram revestidas com DMSA, tendo sido posteriormente funcionalizadas com lisina, obtendo-se na primeira fase um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 110 nm e de 140 nm na segunda. A ligação destas entidades foi confirmada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e, pela análise dos padrões de difração de raio-X, verificou-se que a estrutura cristalina permaneceu inalterada.

De forma a estudar a capacidade destes compostos nas aplicações pretendidas, foram ainda realizadas avaliações por diversas técnicas. Os ensaios de hipertermia magnética, de imagem por ressonância magnética e a medição dos tempos de relaxação, asseguraram a capacidade das nanopartículas no aumento do contraste de imagens, como agentes de contraste negativos, e de aquecimento quando sujeitas a um campo magnético alternado. Nesta fase ficou evidente que as NPs funcionalizadas com lisina apresentavam um maior potencial quando aplicadas tanto em diagnóstico por imagem, como em tratamento por hipertermia. Deste modo, ficou evidente que este último grupo de nanopartículas se mostra bastante superior para teragnóstico.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas, magnetite, DMSA, lisina, teragnóstico, cancro, IRMN, hipertermia magnética, agentes de contraste.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is considered the disease with the biggest social impact, accounting for 1 in 7 deaths worldwide. Thus, the extreme importance of the development of innovative techniques for its treatment and diagnosis, led to the emergence of a concept that aims at the interconnection between these two stages, usually named theranostic. In recent years, due to their small size, high surface / volume ratio and magnetization, the possibility of integrating nanoparticles of iron oxides (IONPs) in several biomedical applications has been studied.

In this master thesis, aqueous suspensions of magnetite superparamagnetic nanoparticles (Fe_3O_4) with an average diameter of 10 nm were synthesized by the chemical precipitation method. The objective was to test its application as contrast agents in nuclear magnetic resonance imaging and as a treatment technique by magnetic hyperthermia.

Since these particles have a natural tendency to form aggregates and to precipitate when in aqueous solution, the modification of its surface with biocompatible surfactants was mandatory to facilitate its application in physiological environments. They were coated with DMSA and later functionalized with lysine, yielding hydrodynamic diameters of approximately 110 nm and 140 nm, respectively. The binding of these entities was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy and by the analysis of the X-ray diffraction patterns, was found that the crystal structure remained unchanged.

In order to study the capacity of these compounds in the intended applications, several techniques were evaluated. Magnetic hyperthermia and magnetic resonance imaging assays along with the measurement of relaxation times, ensured the ability of nanoparticles to enhance image contrast similarly to negative contrast agents, and to heating when subjected to an alternating magnetic field. In this stage became evident that the nanoparticles functionalized with lysine presented a greater potential when applied in diagnostic imaging and in treatment by hyperthermia. In this way, it was evident that this last group of nanoparticles is shown to be superior enough for theranostic.

Keywords: magnetic nanoparticles, magnetite, DMSA, lysine, theranostic, cancer, MRI, magnetic hyperthermia, contrast agent.

ÍNDICE GERAL

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | CONTEXTUALIZAÇÃO | 1 |
| 1.1 | IMPACTO SÓCIO-ECONÓMICO DO CANCRO | 1 |
| 1.2 | OBJETIVOS DO TRABALHO | 2 |
| 1.3 | TRABALHOS ANTERIORES | 2 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 5 |
| 2.1 | NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO (IONPs) | 5 |
| 2.1.1 | <i>Configurações estruturais</i> | 6 |
| 2.1.2 | <i>Comportamentos magnéticos dos materiais</i> | 7 |
| 2.1.3 | <i>Superparamagnetismo das mNPs</i> | 9 |
| 2.2 | MÉTODOS DE SÍNTESE DE IONPs | 10 |
| 2.2.1 | <i>Precipitação química</i> | 10 |
| 2.3 | REVESTIMENTO E ESTABILIZAÇÃO DAS IONPs | 11 |
| 2.3.1 | <i>Revestimento de DMSA</i> | 12 |
| 2.3.2 | <i>Funcionalização com aminoácidos</i> | 13 |
| 2.3.2.1 | <i>Lisina</i> | 13 |
| 2.4 | APLICAÇÕES EM TERAGNÓSTICO | 14 |
| 2.4.1 | <i>Ressonância magnética nuclear</i> | 15 |
| 2.4.1.1 | <i>Princípios de funcionamento</i> | 15 |
| 2.4.1.2 | <i>Agente de contraste</i> | 19 |
| 2.4.2 | <i>Hipertermia magnética</i> | 21 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 | SÍNTESE DE mNPs DE MAGNETITE | 25 |
| 3.1.1 | <i>Precipitação química</i> | 25 |
| 3.1.1.1 | <i>Materiais</i> | 25 |
| 3.1.1.2 | <i>Procedimento</i> | 25 |
| 3.2 | DETERMINAÇÃO DA [Fe]/[NPs] POR ESPETROSCOPIA DE UV-VIS | 27 |
| 3.2.1 | <i>Método colorimétrico da fenantrolina</i> | 27 |
| 3.2.1.1 | <i>Materiais</i> | 27 |
| 3.2.1.2 | <i>Procedimento</i> | 27 |
| 3.3 | REVESTIMENTO DAS NPs COM DMSA | 28 |
| 3.3.1.1 | <i>Materiais</i> | 28 |
| 3.3.1.2 | <i>Procedimento</i> | 28 |
| 3.4 | FUNCIONALIZAÇÃO COM AMINOÁCIDO DE LISINA | 28 |
| 3.4.1 | <i>Materiais</i> | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4.2 | <i>Procedimento</i> | 28 |
| 3.5 | CARACTERIZAÇÃO | 29 |
| 3.5.1 | <i>Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> | 29 |
| 3.5.2 | <i>Difração de Raio-X (DRX)</i> | 30 |
| 3.5.3 | <i>Difração dinâmica da luz (DLS)</i> | 30 |
| 3.5.4 | <i>Magnetização</i> | 30 |
| 3.5.5 | <i>Hipertermia magnética</i> | 30 |
| 3.5.6 | <i>Relaxometria por RMN</i> | 30 |
| 3.5.7 | <i>Imagem por RMN</i> | 31 |
| 3.5.8 | <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> | 31 |
| 3.5.9 | <i>Ensaio de citotoxicidade</i> | 31 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.1 | <i>DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ</i> | 34 |
| 4.2 | <i>DIFRAÇÃO POR RAIOS X</i> | 38 |
| 4.3 | <i>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER</i> | 40 |
| 4.4 | <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</i> | 43 |
| 4.5 | <i>MAGNETIZAÇÃO</i> | 45 |
| 4.6 | <i>RELAXOMETRIA POR RMN</i> | 45 |
| 4.7 | <i>IMAGEM POR RMN</i> | 49 |
| 4.8 | <i>HIPERtermia magnética</i> | 54 |
| 4.9 | <i>CITOTOXICIDADE</i> | 57 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 59 |
| 5.1 | <i>CONCLUSÕES</i> | 59 |
| 5.2 | <i>PERSPECTIVAS FUTURAS</i> | 62 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 63 |
| 7 | ANEXOS | 70 |
| | ANEXO 1 - INCIDÊNCIA/MORTALIDADE DO CANCRO | 70 |
| | ANEXO 2 -ESPECTRO DE DRX DA MAGNETITE/MAGMITE | 70 |
| | ANEXO 3 - RELAXIVIDADES DE ALGUMAS IONPs..... | 71 |
| | ANEXO 4 -VALORES DE SAR DE ALGUMAS IONPs..... | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Estimativa do número de novos casos de cancro em todo o Mundo e em certas zonas continentais, no ano de 2012. Adaptado de [4]. | 1 |
| Figura 2.1 - Estrutura cristalina da magnetite (a), magmite (b) e hematite (c). Adaptado de [11]. | 7 |
| Figura 2.2 - Comportamento microscópica de materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos, na presença e ausência de um campo magnético externo. Adaptado de [15]. | 7 |
| Figura 2.3 - Variação da coercividade (H_c) com o tamanho das NPs. É possível evidenciar que o aumento da dimensão das NPs é acompanhado por um aumento do número de domínios. Retirado de [21]. | 9 |
| Figura 2.4 - Curva de campo magnético vs magnetização teórica para NPs superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM). Na curva a azul, ao contrário da verde, é possível evidenciar histerese. Adaptado de [21]. | 10 |
| Figura 2.5 – Estrutura superficial das nanopartículas de magnetite. Na ausência de qualquer revestimento estas apresentam grupos hidroxilos à superfície. | 12 |
| Figura 2.6 - Fórmula estrutural do DMSA (a) e IONPs revestidas com moléculas de DMSA (b). Adaptado de [31]. | 13 |
| Figura 2.7 – Estrutura química do aminoácido de lisina. Retirado de [37]. | 14 |
| Figura 2.8 – Conjugações possíveis de NPs de magnetite com aminoácido de lisina. Adaptado de [35]. | 14 |
| Figura 2.9 – Campo magnético gerado devido ao movimento de uma partícula carregada positivamente, com criação de um momento magnético μ . Comportamento idêntico a um pequeno íman. Adaptado de [43]. | 16 |
| Figura 2.10 - Orientações possíveis dos átomos de hidrogénio quando aplicado um campo magnético externo (adaptado de [49]) (a) Nível de energia referente ao estado paralelo (E_1) e antiparalelo (E_2) (adaptado de [51]) (b). | 16 |
| Figura 2.11 – Na representação da esquerda podemos ver os spins em movimento de precessão com uma população superior no estado paralelo (a). A ilustração da direita representa a magnetização total produzida (b). Adaptado de [43]. | 17 |
| Figura 2.12 – Funcionamento a nível atómico de um sistema de RMN. Adaptado de [46]). | 18 |

| | |
|---|----|
| Figura 2.13 – Recuperação de M_z até M_0 segundo um exponencial, sendo T_1 a recuperação até 63% (a). Decaimento exponencial de M_{xy} até 0, sendo T_2 o tempo necessário para decrescer até 37% (b). Adaptado de [52]..... | 19 |
| Figura 2.14 – Imagem de RM de tumor em cérebro humano sem (a) e com (b) contraste de gadolínio. Ocorre intensificação do sinal nas periferias do tecido maligno. Adaptado de [52]...... | 20 |
| Figura 2.15 – Imagem de RM de fígado humano sem (a) e com (b) contraste à base IONPs. Tumores malignos no fígado não absorvem IONPs, ficando apenas o tecido saudável representado a escuro [52]..... | 21 |
| Figura 2.16 – Esquema ilustrativo dos processos de relaxação de Néel e de Brown. Baseado em [24]22 | |
| Figura 3.1 - Esquema de montagem utilizado na síntese por precipitação química..... | 26 |
| Figura 3.2 – Sequência de acontecimentos ao longo do procedimento | 26 |
| Figura 3.3 - Esquema adaptado da reação de funcionalização das NPs com a Lisina. Adaptado de [74]. | 29 |
| Figura 4.1 – Curvas de autocorrelação (a) de NPs@DMSA para diferentes concentrações de ferro e (b) para a uma mesma concentração amostras de NPs sem revestimento e revestidas com DMSA. | 34 |
| Figura 4.2 – (a) Diâmetros hidrodinâmicos pequenos (D_1) e grandes (D_2) e respectivos índices de polidispersão (b), de NPs sem revestimento sintetizadas por precipitação química a 25°C, 50°C e 80°C..... | 35 |
| Figura 4.3 – Diâmetros hidrodinâmicos pequenos (D_1) e grandes (D_2) de NPs@DMSA com 2h e 3h em banho de ultrassons. | 37 |
| Figura 4.4 – Espetros de DRX de NPs de magnetite sintetizadas a diferentes temperaturas. | 39 |
| Figura 4.5 – Espetro de DRX de NPs de magnetite (PQ4) e de NPs@DMSA (RD1)..... | 40 |
| Figura 4.6 – Espetros de FTIR referentes às NPs resultantes das sínteses PQ1 (25°C), PQ2 (50°C), PQ3 (80°C) e PQ4 (55°C)..... | 41 |
| Figura 4.7 – Espetros de FTIR referentes a NPs sem revestimento de PQ4 (castanho) e de NPs revestidas com DMSA (RD2). | 42 |
| Figura 4.8 – Conjugações possíveis entre as NPs@DMSA e o aminoácido de lisina. A configuração da esquerda é mais provável de acontecer, uma vez que o pK_a do $-NH_3^+$ daquela posição, é mais reduzido. No entanto também existe a possibilidade de a conjugação da direita ocorrer. | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.9 –Espectro de FTIR da Lisina pura (a) [35] e da amostra de NPs@DMSA@Lys obtida (b). | 43 |
| Figura 4.10 – Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 1 h..... | 43 |
| Figura 4.11 - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 3 h. | 44 |
| Figura 4.12 - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 5 h. | 44 |
| Figura 4.13 – Magnetização em função do campo magnético aplicado a 300 K (laranja) e a 7 K (azul) para NPs@DMSA. | 45 |
| Figura 4.14 – Taxa de relaxação longitudinal (a) e transversal (b) de NPs@DMSA (a vermelho) e NPs@DMSA@Lys (a preto). As retas representam os ajustes lineares efetuados, cujo declive representa o valor da relaxividade longitudinal (no gráfico (a)) e transversal (no gráfico (b))..... | 47 |
| Figura 4.15 - Ensaio de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA. Número de médias igual a 8. | 50 |
| Figura 4.16 - Ensaio de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA. Número de médias igual a 32. | 50 |
| Figura 4.17 - Ensaio de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA@Lys. Número de médias igual a 32. | 51 |
| Figura 4.18 – gráficos com o número de pixéis encontrados em função do tom de cinzento, para cada uma das concentrações. O gráfico da esquerda é referente a amostras de NPs@DMSA e o gráfico da direita a NPs@DMSA@Lys. | 52 |
| Figura 4.19 – Corte de perfil das amostras de NPs@DMSA com os respetivos tons de cinzento..... | 53 |
| Figura 4.20 – Corte de perfil das amostras de NPs@DMSA@Lys com os respetivos tons de cinzento. | 53 |
| Figura 4.21 - Variações de temperatura (ΔT em $^{\circ}\text{C}$) em função da concentração de ferro para amostras de NPs@DMSA (cinzento claro) e NPs@DMSA@Lys (cinzento escuro) em água ultrapura (a) e ágar 0,5% (b). | 54 |
| Figura 4.22 – Variação da temperatura, ΔT , em função da concentração de ferro em solução. O gráfico da esquerda é referente às amostras em água ultrapura e o da direita em ágar 0,5%. As retas a preto são referentes às amostras de NPs@DMSA@Lys e as a cinzento às de NPs@DMSA. | 55 |
| Figura 4.23 – Valores médios da taxa de absorção específica em função da concentração de Fe e do meio. O gráfico da esquerda é referente às amostras de NPs@DMSA e o da esquerda de NPs@DMSA@Lys. | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.24 – Placa com NPs@DMSA em contacto com células Vero após a adição da resazurina e antes de serem medidas as absorvâncias | 57 |
| Figura 4.25 – Viabilidade celular de células Vero após 48 h em contacto direto com NPs@DMSA para concentrações compreendidas entre 31,25 µg/mL e 500 µg/mL..... | 58 |
| Figura 7.1 – Incidência e mortalidade do cancro a nível mundial e por zonas continentais. As barras a azul representam a incidência, e as barras a vermelho a mortalidade. Retirado de [4]. | 70 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Propriedades físicas de diferentes óxidos de ferro – hematite, magnetite e magmite. Adaptado de [13] com fonte em [12] | 6 |
| Tabela 2.2– Comportamento magnético dos materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos, com exemplos ilustrativos | 8 |
| Tabela 4.1 – Resumo das sínteses por precipitação química (PQ) realizadas | 33 |
| Tabela 4.2 – Resumo dos revestimentos com DMSA (RD) realizados | 33 |
| Tabela 4.3 - Resumo das funcionalizações com Lisina (FL) realizados | 34 |
| Tabela 4.4 – Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos (D_1 e D_2) e respectivos índices de polidispersão em função da concentração de NPs. Dados relativos a amostras de NPs@DMSA ... | 36 |
| Tabela 4.5 - Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos e respectivos índices de polidispersão em função da concentração de NPs. Dados relativos a amostras de NPs@DMSA e de NPs@DMSA@Lys | 37 |
| Tabela 4.6 – Tempos de relaxação transversais e longitudinais de NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys, para concentrações compreendidas entre 0,5 mM e 3,0 mM. Nas colunas ao lado de T1 e T2 estão as atenuações em percentagem. | 46 |
| Tabela 4.7 – Relaxividade longitudinal e transversal das NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys e respectivos fatores de correlação (R^2) | 48 |
| Tabela 4.8 – Valores médios do tom de cinzento, numa escala de 0 a 255, em função da concentração (mM) de NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys | 52 |
| Tabela 7.1 - Picos característicos e respectivas intensidades (%), dos espectros de difração de raios-X da magnetite e da magmite. Adaptado de [86] | 71 |
| Tabela 7.2 – Relaxividades longitudinais e transversais de algumas nanopartículas de óxidos de ferro (IONPs) quando submetidos a um campo magnético de 7 T, bem como as respectivas razões r_1/r_2 | 71 |
| Tabela 7.3 – Valores de taxa de absorção específica de algumas IONPs, com revestimentos e diâmetros de núcleo diferentes | 72 |

ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------|---|
| AC | Agente de contraste |
| B_0 | Campo magnético |
| DLS | Dispersão dinâmica da luz |
| DMSA | Ácido-2,3-dimercaptosuccínico |
| DRX | Difração de raio-X |
| FID | <i>Free induction decay</i> |
| FL | Reação de funcionalização com lisina |
| FTIR | Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier |
| IONPs | Nanopartículas de óxidos de ferro |
| IRMN | Imagem por ressonância magnética nuclear |
| M_0 | Magnetização total |
| mNPs | Nanopartículas magnéticas |
| M_{xy} | Magnetização transversal |
| M_z | Magnetização longitudinal |
| NPs | Nanopartículas |
| NPs@DMSA | Nanopartículas revestidas com DMSA |
| NPs@DMSA@Lys | Nanopartículas revestidas com DMSA e funcionalizadas com Lisina |
| PQ | Precipitação química |
| r_1 | Relaxividade longitudinal |
| r_2 | Relaxividade transversal |
| RD | Reação de revestimento com DMSA |
| RF | Radiofrequências |
| RM | Ressonância magnética |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SAR | Taxa de absorção específica |
| SPIOs | Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas |
| SPM | Superparamagnéticas |
| T_1 | Tempo de relaxação longitudinal |
| T_2 | Tempo de relaxação transversal |
| TE | Tempo de eco |
| TEM | Microscopia eletrónica de transmissão |
| t° | Temperatura |

| | |
|--------|--|
| TR | Tempo de repetição |
| USPIOs | Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas ultrapequenas |

CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 IMPACTO SÓCIO-ECONÓMICO DO CANCRO

Numa sociedade crescente e com tendência a envelhecer, o cancro tem-se mostrado uma realidade cada vez mais presente no nosso dia-a-dia. Atualmente é tomada como uma das principais causas de morte, sendo que é responsável por 1 em cada 7 mortes em todo o mundo [1]. De acordo com a International Agency for Research on Cancer, houve 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes devido a esta doença em 2012 (anexo Anexo 1 - Incidência/mortalidade do cancro). Com este padrão, prevê-se que estes valores possam vir a aumentar para 21,7 milhões de casos e 13 milhões de mortes até 2030 [1]. Em Portugal representa a segunda maior causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares [2], sendo que segundo a GLOBOCAN, apenas em 2012 houve cerca de 49 mil de novos casos e 24 mil mortes [3].



Figura 1.1 - Estimativa do número de novos casos de cancro em todo o Mundo e em certas zonas continentais, no ano de 2012. Adaptado de [4].

Para além do custo humano associado ao cancro, o custo financeiro é substancial. Custos estes que podem estar relacionados com o tratamento em si, cuidados e reabilitação, ou custos indiretos. O

custo global exato do cancro é desconhecido, no entanto acredita-se que esteja a rondar as centenas de milhares de milhões de dólares anuais. Apenas os EUA, registaram um custo médio estimado de 88,7 mil milhões de dólares [1]. Em Portugal, com uma população cerca de 30 vezes inferior, esta realidade passa para um custo anual de aproximadamente 565 milhões de euros [2].

Além da falta de contextualização da população, a deteção em estágios tardios e os tratamentos inadequados (principalmente nos países em desenvolvimento), são alguns dos fatores que fazem com que esta doença seja tão mortífera.

1.2 OBJETIVOS DO TRABALHO

Nesta vertente torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos de diagnóstico inovadores e eficientes, que promovam uma deteção rigorosa e precoce da doença, bem como de tratamento, de forma a dar a melhor resposta ao seu combate. Deste modo, surge o presente projeto de investigação, que consiste na síntese e estabilização de nanopartículas magnéticas (mNPs) por diversos tensioativos biocompatíveis, tendo em vista o estudo do seu potencial em futuras aplicações de teragnóstico. Quando aplicado no combate do cancro, este conceito, é habitualmente traduzido como o conjunto de métodos ou sistemas capazes de intervir tanto no diagnóstico da doença como ao nível do seu tratamento. Especificamente nesta tese de mestrado, pretendesse estudar a capacidade e de que forma estas nanopartículas se comportam como agentes de contraste na monitorização por imagem de RMN, bem como na sua capacidade de aquecimento em tratamento por hipertermia magnética. Deste modo terá de ser realizada uma extensa revisão bibliográfica sobre os diversos conceitos enunciados, quais as características/propriedades pretendidas, métodos de síntese das NPs, os tipos revestimentos mais apropriados para as aplicações em questão, bem como os métodos mais eficientes de ligação destes compostos.

1.3 TRABALHOS ANTERIORES

De forma a testar a aplicabilidade de mNPs como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética, Gabriela Pereira, sintetizou NPs de óxido de ferro pelo método de precipitação química, revestidas com ácido oleico (AO) a diferentes concentrações (64%, 96%, 128% e 192%). Para além de diversos testes de caracterização, foram realizados ensaios de relaxometria, capazes de medir os tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água, aquando do contacto com as NPs, bem como ensaios de imagem por ressonância magnética nuclear. Como principais conclusões, foi possível retirar que tanto o aumento da percentagem de AO, como do pH, resulta num aumento do diâmetro hidrodinâmico das partículas, sendo que estas se encontram estáveis em solução para pHs compreendidos entre 6,6 e 10,1. As nanopartículas revestidas com 128% de ácido oleico, foram as que se mostraram mais

promissoras como agentes de contraste, tendo sido ainda comprovado que dos tempos de relaxação, o transversal foi o que maioritariamente era afetado. Para além do ácido oleico, também o dioctil sulfosuccinato de colina (líquido iónico) foi utilizado como revestimento, de forma estudar outros compostos que pudessem estabilizar as NPs. Este estudo foi abandonado, uma vez que as soluções com estes composto, originavam partículas com elevados índices de polidispersão e formação de agregados com dimensões micrométricas [5].

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste subcapítulo vão ser descritos, com algum detalhe, conceitos inerentes ao projeto em questão, dando-se um especial enfoque às nanopartículas de óxidos de ferro e suas propriedades, métodos de síntese, a sua necessidade de revestimento e possíveis aplicações em teragnóstico. O objetivo centra-se em familiarizar os futuros leitores com o tema em questão, tendo sido realizada uma pesquisa, não só focada em aspetos do ponto de vista teóricos, como dos avanços alcançados até aos dias de hoje.

2.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO (IONPs)

Antes de definir nanopartículas de óxidos de ferro, convém entender outros conceitos mais abrangentes onde este se insere. Segundo a *International Organization for Standardization* (ISO), um “nanomaterial” entende-se como um material discreto, que apresenta pelo menos uma das suas dimensões externas compreendidas entre 1 e 100 nm [6]. Em 2011, a comissão europeia acrescentou ainda que a condição anterior deveria verificar-se em pelo menos 50% da distribuição tamanho-número das partículas, sendo que o material natural, incidental ou fabricado, poderia ser constituído por partículas num estado agregado, desagregado ou em aglomerado [7]. Segundo a mesma organização, uma partícula é uma porção minúscula de matéria com fronteiras físicas definidas [6]. Quando nos referimos a uma nanopartícula, consideramos que estas, estão inseridas num subgrupo dos nanomateriais, caracterizadas por apresentar todas as suas dimensões externas à escala nanométrica (entre 1 e 100 nm) [7]. Dentro do grupo anterior, podemos encontrar as nanopartículas magnéticas, que para além de se enquadrarem na definição referida, ainda apresentam na sua composição elementos metálicos. Estes elementos podem ser metais puros, ligas ou seus óxidos, sendo os elementos mais comuns o ferro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), ouro (Au) e platina (Pt). As suas propriedades surgem, não só da sua composição atómica, como também da combinação da sua estrutura cristalina e efeito do seu tamanho [8][9]. As nanopartículas de óxidos de ferro são habitualmente mais recorridas em aplicações biomédicas, destacando-se devido à sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade, bem como por apresentarem um processo relativamente fácil de síntese [9][10].

2.1.1 Configurações estruturais

Tipicamente, dentro deste subgrupo de mNPs, podemos encontrar três configurações estruturais distintas – magnetite (Fe_3O_4), magmite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [9]. Estes óxidos de ferro, representam uma família de materiais que, devido à sua diversidade de propriedades (nomeadamente magnéticas), se têm tornado muito recorridas nas mais diversas investigações científicas [11]. Destas configurações, a magnetite, quando exposta a um ambiente aeróbio é gradualmente oxidada a magmite [12]. Na tabela 2.1 podemos analisar um conjunto de propriedades que caracterizam cada uma das configurações referidas.

Tabela 2.1 – Propriedades físicas de diferentes óxidos de ferro – hematite, magnetite e magmite. Adaptado de [13] com fonte em [12]

| PROPRIEDADES | HEMATITE | MAGNETITE | MAGMITE |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Fórmula molecular | $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ | Fe_3O_4 | $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ |
| Massa molar (g/mol) | 159,69 | 215,53 | 159,69 |
| Ponto de fusão (°C) | 1566 | 1583-1597 | - |
| Densidade (g/cm ³) | 5,26 | 5,18 | 4,87 |
| Cristalografia | Romboédrico, hexagonal | Cúbico | Cúbico |
| Tipo de magnetismo | Ferromagnético fraco | Ferromagnético | Ferromagnético |
| Cor | | | |

Estes três óxidos de ferro, apresentam aniões de oxigénio ligados a catiões de ferro octaédricos ou tetraédricos. A hematite, distingue-se das outras duas configurações por apresentar uma disposição hexagonal dos seus aniões, com os iões de ferro (Fe^{3+}) a ocupar zonas octaédricas. Esta disposição de iões resulta numa geometria geral em lâminas de octaedros com arestas partilhadas. Tanto a magnetite como a magmite, apresentam uma estrutura cristalina semelhante, com uma disposição segundo um arranjo cúbico dos seus iões de oxigénio, diferenciando-se uma da outra, pelo facto de a primeira conter átomos de ferro em dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e a segunda apenas em um (Fe^{3+}). Na magnetite, os iões Fe^{3+} ocupam posições entre locais octaédricos e tetraédricos (igualmente distribuídos) e os iões Fe^{2+} em zonas octaédricas. No caso da magmite, os catiões (iões de Fe^{3+}) estão distribuídos em 8 locais tetraédricos e 16 octaédricos. [11][14].

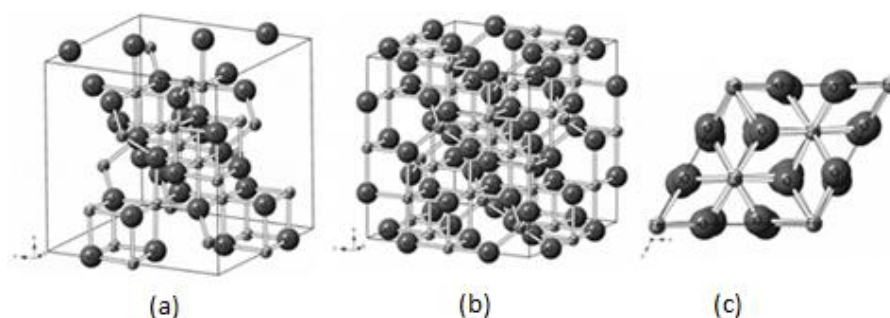


Figura 2.1 - Estrutura cristalina da magnetite (a), magmte (b) e hematite (c). Adaptado de [11].

De todos os óxidos de ferro referidos, a magnetite, é a que apresenta as propriedades mais interessantes, devido à presença de catiões de ferro em dois estados de valência, numa estrutura de espinela inversa [9]. Uma vez que os iões Fe^{2+} residem apenas em zonas octaédricas, ao contrário dos Fe^{3+} que estão igualmente distribuídos entre posições octaédricas e tetraédricas, são estes catiões (Fe^{2+}) que são responsáveis pela magnetização de saturação e pelo comportamento magnético do material [11].

2.1.2 Comportamentos magnéticos dos materiais

A classificação de um material quanto às suas propriedades magnéticas, baseia-se na resposta da matéria à presença de um campo magnético, e pode ser quantificada pela suscetibilidade magnética (χ_m), definida como a razão entre a magnetização induzida (M) e a intensidade do campo magnético aplicado (H), como representado pela equação 2.1 [10], [15].

$$\chi_m = \frac{M}{H} \quad \text{Equação 2.1}$$

De facto, os momentos magnéticos individuais dos átomos de um determinado material, podem apresentar orientações preferenciais (paralela ou antiparalela) relativamente a um campo magnético externo aplicado. Consoante o comportamento observado, durante e após a aplicação deste mesmo campo, podemos agrupar e classificar os materiais como – diamagnéticos, paramagnéticos ou ferromagnéticos [10], [15]. Na figura 2.2 está uma representação do comportamento destes três materiais.

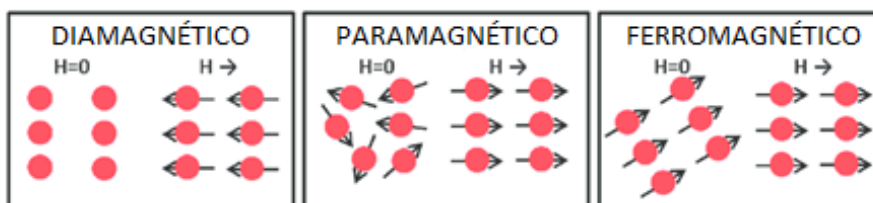


Figura 2.2 - Comportamento microscópica de materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos, na presença e ausência de um campo magnético externo. Adaptado de [15]

Materiais diamagnéticos caracterizam-se por suscetibilidades muito pequenas e negativas, resultado de uma orientação antiparalela dos seus momentos magnéticos quando um campo magnético externo é aplicado [10], [15]. Esta orientação preferencial leva a uma leve redução do campo magnético local e desaparece quando o campo deixa de atuar sobre estes materiais. Por outro lado, temos materiais que tendem a alinhar os seus momentos magnéticos paralelamente ao campo magnético aplicado, sendo que na ausência do mesmo apresentam uma orientação aleatória (que resulta numa magnetização nula) [10], [15], [16]. Estes são chamados paramagnéticos, caracterizam-se por valores de suscetibilidade pequenos, mas positivos, e ao contrário dos anteriores, aumentam levemente o campo magnético local quando sujeitos ao campo externo. Por fim, temos os materiais ferromagnéticos, que embora na presença de um campo magnético externo orientem os seus momentos da mesma forma que os paramagnéticos, caracterizam-se por suscetibilidades bastante superiores [10], [15]–[17]. Para além de aumentarem fortemente o valor da intensidade do campo local, estes materiais têm ainda a capacidade de ficar permanentemente magnetizados (mesmo na ausência de campo), sendo por isso considerados materiais com “memória” magnética [15]–[17]. A este fenómeno chamamos histerese magnética, que se caracteriza pela capacidade de um sistema de preservar as suas propriedades na ausência do estímulo que as gerou. Estes materiais perdem a sua magnetização espontânea (passando a comportarem-se como paramagnéticos), a partir de uma determinada temperatura crítica, chamada temperatura de Curie [18][17]. Na tabela 2.2 estão organizadas as suscetibilidades magnéticas de cada um destes materiais, com exemplos ilustrativos de compostos com estas características.

Tabela 2.2– Comportamento magnético dos materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos, com exemplos ilustrativos

| Comportamento magnético | Suscetibilidade magnética | Exemplos | Referências |
|-------------------------|--|---|------------------|
| Diamagnetismo | -10^{-6} a -10^{-3} Não varia com a t° | Gases inertes e alguns elementos não metálicos (B, Si, P) | [10], [15], [16] |
| Paramagnetismo | 10^{-6} a 10^{-1} Diminui com a t° | Metais como o Cr, Mn | [10], [15], [16] |
| Ferromagnetismo | Até 10^6 T_{curie} varia com o material | Fe, Co, Ni e algumas ligas metálicas. | [15], [16] |

Quanto à sua ordenação a nível atómico, os materiais ferromagnéticos organizam os diversos momentos magnéticos de cada átomo paralelamente entre si e em regiões designadas domínios [19], [20]. Estas zonas podem apresentar direções distintas, fazendo com que algumas se cancelem. Deste modo, esta organização explica o facto de medições da magnetização serem inferiores ao esperado, caso não existissem tais zonas. De facto, quando um material é magnetizado por ação de um campo magnético,

o que ocorre é um alinhamento dos momentos destas regiões segundo a direção que lhe confere um estado de menor energia [19]

Existem três parâmetros principais, que são responsáveis por descrever a magnetização destes materiais - a magnetização de saturação (M_s), que representa a máxima orientação dos domínios perante o campo magnético; a coercividade (H_c), que representa o campo necessário para reduzir a magnetização a zero; e a magnetização remanescente (M_R), que é a magnetização residual quando nenhum campo é aplicado [21].

2.1.3 Superparamagnetismo das mNPs

A diminuição do tamanho das NPs é acompanhada por uma diminuição do número de domínios, até se atingir o limite crítico, em que o material fica composto apenas por um único domínio. Nestes limites, um material pode estar uniformemente magnetizado, com os spins todos alinhados paralelamente e na mesma direção. Caso se continue a diminuir o tamanho das partículas, até se ultrapassar um valor chamado raio superparamagnético (r_{SP}), ocorre a transição das partículas de um estado ferromagnético para superparamagnético [21]. Na figura 2.3 podemos ver os limites dimensionais, entre os domínios ferromagnéticos e superparamagnéticos, relacionando a coercividade (H_c) em função do tamanho da partícula (d).

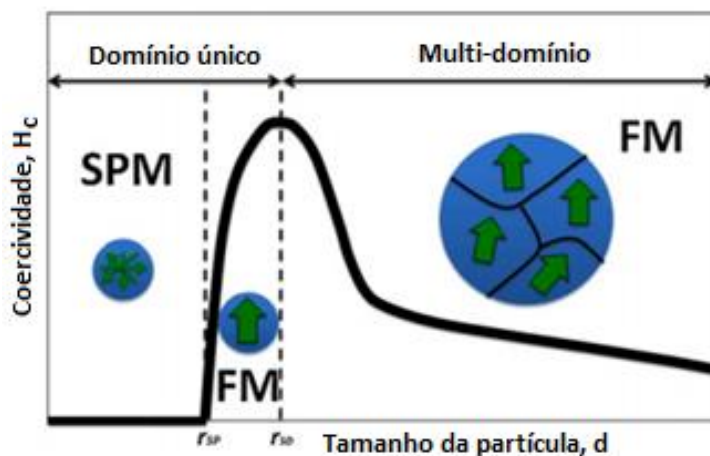


Figura 2.3 - Variação da coercividade (H_c) com o tamanho das NPs. É possível evidenciar que o aumento da dimensão das NPs é acompanhado por um aumento do número de domínios. Retirado de [21]

A estas dimensões, habitualmente para valores inferiores a 20 nm [9], as IONPs são caracterizados por suscetibilidades magnéticas muito superiores aos materiais paramagnéticos, induzindo uma forte resposta magnética em campos relativamente baixos [19]. Caracterizam-se ainda, por não apresentar magnetização após a remoção de campos externos, permitindo que as partículas se mantenham estáveis e evitando agregações [10]. Estas propriedades mostram-se grandes vantagens para aplicações

biomédicas, nomeadamente na aplicação *in vivo*. Na figura 2.4, podemos visualizar o modelo que retrata a magnetização em função do campo magnético aplicado, para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e paramagnéticas (PM) [21].

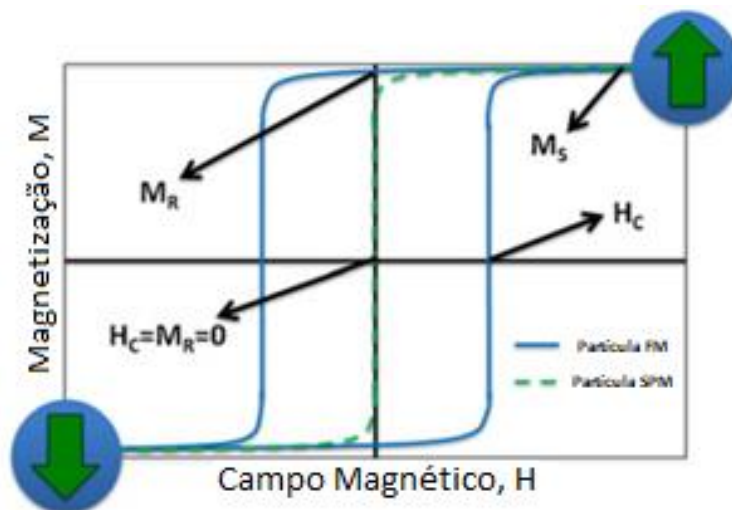


Figura 2.4 - Curva de campo magnético vs magnetização teórica para NPs superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM). Na curva a azul, ao contrário da verde, é possível evidenciar histerese. Adaptado de [21].

2.2 MÉTODOS DE SÍNTESE DE IONPs

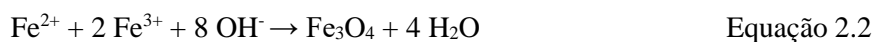
Existem duas abordagens quanto ao método de produção de mNPs - métodos físicos e métodos químicos. Os primeiros são processos mais elaborados, complexos e pouco precisos no controlo do tamanho das partículas. Por outro lado, os métodos químicos são bem mais simples e flexíveis, possibilitando um maior controlo do tamanho, composição e forma destas [22]. Ao longo desta secção vão ser abordados alguns conceitos teóricos relativamente ao método de síntese por precipitação química.

2.2.1 Precipitação química

Este método apresenta-se como a via química mais recorrida no que toca à produção de NPs de óxido de ferro, não só pelas temperaturas relativamente baixas a que se processa [23], mas também devido à sua simplicidade e eficácia [24]. Destaca-se ainda por ser um processo relativamente económico e rápido, que resulta em grandes quantidades de NPs [18], quando comparado com outros métodos. Como principais limitações apresenta algumas dificuldades no que toca ao controlo do tamanho e forma das nanopartículas [18], sendo que parâmetros como o tipo de sais usados, a proporção de iões Fe^{2+} e Fe^{3+} , o pH da base, a força iónica do meio e a temperatura, têm alguma influência no controlo destas características [25]. Willard, refere que a concentração dos sais metálicos, se apresenta como um dos fatores que traduz um maior efeito no tamanho da NPs, sendo que baixas concentrações

resultam num crescimento limitado das partículas, com tamanhos uniformes, e altas concentrações num aumento deste crescimento, com consequente perda de uniformidade de tamanho [18]. Também a temperatura influencia esta característica, sendo que um aumento da mesma se traduz numa diminuição do tamanho das NPs (para temperaturas inferiores a 50°C), e aumentam o seu tamanho com o aumento da temperatura (para temperaturas superiores a 50°C) [26]. É de referir ainda, que as partículas resultantes por este método caracterizam-se habitualmente por apresentar uma baixa cristalinidade e algum nível de agregação [8].

Como o próprio nome sugere, a obtenção destes óxidos de ferro (habitualmente magnetite), resultam da co-precipitação de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa, sendo este processo experimental desencadeado pela adição de uma solução básica [22]. Esta reação, pode ser descrita pela equação 2.2, sendo habitualmente mantido um rácio de Fe^{2+} e Fe^{3+} de 1:2 [8][22].



Caso o ambiente não seja livre de oxigénio, o Fe_3O_4 apresenta tendência para se oxidar, segundo a equação 2.3 [22]:



Esta oxidação pode ocorrer antes ou durante a precipitação, o que irá afetar as propriedades físicas e químicas das mNPs [8]. Deste modo a reação descrita pela equação 2.2, deve ser realizada em condições anaeróbias, sendo habitualmente inserido um gás inerte (p.e. azoto), que para além de impedir grande parte da oxidação, permite produzir NPs com dimensões inferiores, por prevenir a formação de agregados [22][2].

2.3 REVESTIMENTO E ESTABILIZAÇÃO DAS IONPs

As nanopartículas de magnetite “nuas” (na ausência de qualquer tipo de revestimento), encontrando-se em meio aquoso, apresentam à sua superfície grupos hidroxilos, como ilustrado na figura 2.5. Uma vez que estes grupos funcionais são anfotéricos, podem reagir tanto com ácidos como com bases, carregando positivamente ou negativamente a superfície das NPs em função do pH da solução. O ponto isoelétrico da magnetite é a um pH de aproximadamente 6,8; em torno do qual a densidade de carga à superfície é demasiado baixa e as partículas perdem a sua estabilidade [27].

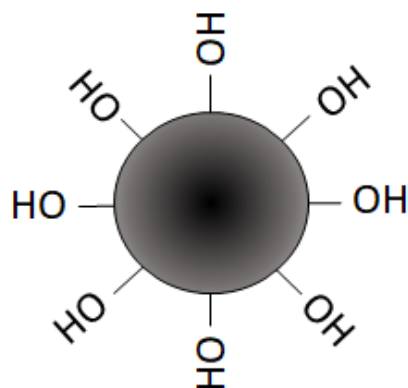


Figura 2.5 – Estrutura superficial das nanopartículas de magnetite. Na ausência de qualquer revestimento estas apresentam grupos hidroxilos à superfície.

Devido a este fator, bem como a elevada razão área superficial/volume e o comportamento hidrofóbico superficial, é de esperar que pequenos agregados “procurem” sucessivamente vizinhos mais próximos (de forma a reduzir a energia à superfície [28]), formando aglomerados cada vez maiores, que consequentemente ficam mais propensos a precipitar [22]. Estes aglomerados, acarretam consigo alterações das propriedades magnéticas de superparamagnéticas para ferromagnéticas, devido ao aumento do tamanho [22]. Deste modo torna-se imprescindível recorrer a agentes tensioativos biocompatíveis como revestimento [29], que podem ser quimicamente ligados ou fisicamente adsorvidos, de forma a tornar possível a sua aplicação em condições fisiológicas [27]. Estes revestimentos devem não só evitar este tipo de agregação, através da criação de forças repulsivas que contrariem as atrativas entre as partículas (magnéticas e de *van der waals*) [27], mas também aumentar a biocompatibilidade, prevenir a sua degradação, e providenciar a ligação a determinados compostos [30]. Existem diversos tipos de revestimentos que promovem a incorporação de tais características. No entanto, é fundamental escolher de forma cuidadosa qual o mais adequado consoante as aplicações que pretendemos dar às NPs.

2.3.1 Revestimento de DMSA

De entre uma enorme variedade de compostos que podem ser utilizados para revestir as NPs, o ácido-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), é um dos que apresenta grande potencialidade, nomeadamente para permitir a ligação de outros compostos. Este ácido é constituído por dois grupos carboxílicos nas terminações, e dois grupos tiol. A ligação desta molécula às nanopartículas de magnetite, é realizada através dos grupos carboxílicos, sendo os grupos tiol responsáveis por criarem ligações entre as várias moléculas de DMSA, originando uma reticulação através das ligações de enxofre em torno das partículas. O estabelecimento desta conjugação, resulta numa carga superficial negativa [31].

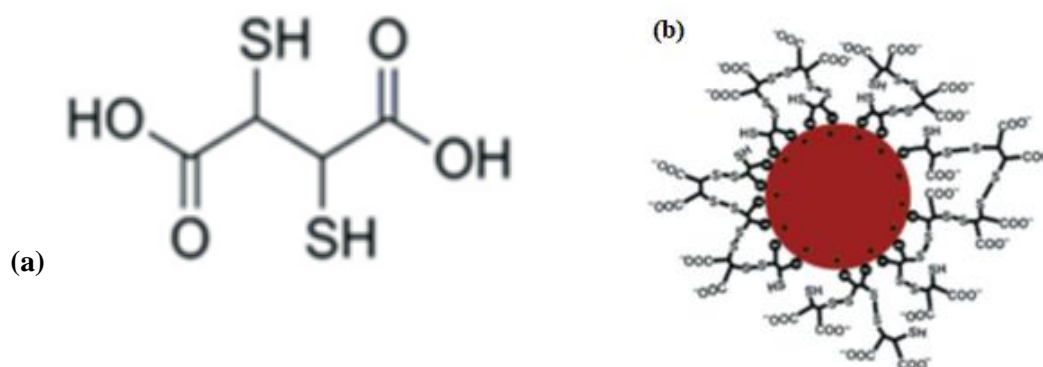


Figura 2.6 - Fórmula estrutural do DMSA (a) e IONPs revestidas com moléculas de DMSA (b). Adaptado de [31]

Com o objetivo de testar a aplicação deste composto como possível revestimento de IONPs, vários foram os testes realizados até ao momento. A sua baixa toxicidade em condições fisiológicas, bem como o excelente comportamento magnético das partículas resultantes, mostrou um enorme potencial das mesmas num vasto conjunto de aplicações biomédicas, entre as quais as que se pretende estudar neste projeto - hipertermia magnética e como agente de contraste em imagens de RMN [32][33][34]. Foram reportados diversos ensaios de interações biológicas de NPs@DMSA *in vitro* e *in vivo*, inclusive em modelos de primatas, que mostraram a inofensividade deste composto quando doseado controladamente [32].

2.3.2 Funcionalização com aminoácidos

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse em sintetizar IONPs revestidas com aminoácidos, por aumentarem a estabilidade destas partículas, bem como por possibilitarem uma grande variedade de interações moleculares por adição de determinados grupos funcionais [35]. Muitos destes aminoácidos, para além de desempenharem um papel importante no organismo, são ainda capazes de atuar a nível da redução de tumores [35] [36], pelo que a sua conjugação com IONPs poderá trazer benefícios.

2.3.2.1 Lisina

A lisina, de forma química $C_6H_{14}N_2O_2$, é classificada como um aminoácido essencial que pode ser encontrado em diversas proteínas que fazem habitualmente parte da nossa alimentação, como as carnes, ovos, leite e derivados. Desempenha algumas funções em mecanismos biológicos, nomeadamente a nível do sistema imunológico, síntese de tecidos e obtenção de energia. Uma vez que não pode ser sintetizado pelo próprio organismo é necessário ser introduzido na nossa alimentação [37]. Na figura 2.7 está representada a estrutura química deste composto.

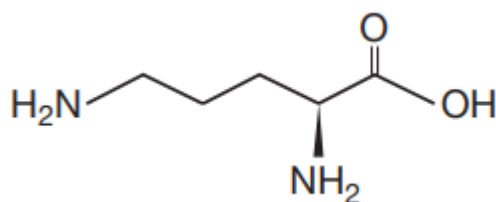


Figura 2.7 – Estrutura química do aminoácido de lisina. Retirado de [37].

Do ponto de vista clínico, vários estudos comprovaram os benefícios que a lisina pode trazer no combate de determinadas doenças, nomeadamente na redução da taxa da infeção do herpes [38], no aumento da absorção de cálcio no combate à osteoporose [39] e alívio da angina do peito [40]. Mais recentemente foi ainda sugerido o benefício deste composto em tratamentos complementares para a esquizofrenia [41]. A sua elevada biocompatibilidade aliada às diversas funções e benefícios que pode desempenhar, fazem deste composto um ótimo componente a ser integrado no revestimento de NPs de magnetite.

Os poucos trabalhos encontrados de uma possível conjugação deste aminoácido diretamente às NPs de magnetite, relatam que este é capaz de interagir com as NPs através do grupo carboxilo, criando ligações covalentes como ilustrado na figura 2.8. O único inconveniente do composto resultante, é facto de este ser menos estável, quando comparado com IONPs revestidas com outras substâncias [35].

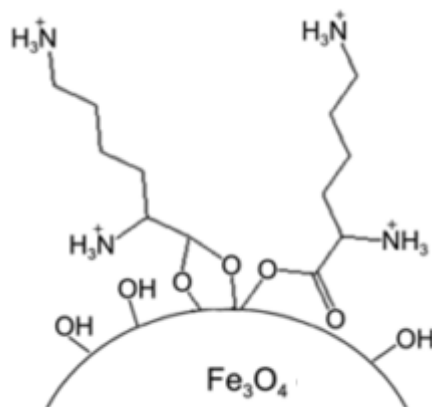


Figura 2.8 – Conjugações possíveis de NPs de magnetite com aminoácido de lisina. Adaptado de [35]

2.4 APLICAÇÕES EM TERAGNÓSTICO

Teragnóstico é um conceito bastante recente que se refere a métodos ou substâncias passíveis de ser utilizadas simultaneamente em diagnóstico e em tratamento. De uma forma mais simples pode ser definido como diagnóstico “mais” tratamento. Quando aplicado especificamente ao combate do cancro, surge um amplo conjunto de aplicações onde se podem integrar as IONPs [42]. Neste estudo, vão ser

exploradas duas abordagens específicas, mais precisamente o diagnóstico por imagem recorrendo à técnica de RMN e o tratamento por hipertermia magnética.

O comportamento superparamagnético, aliado a diversas propriedades e características (dimensões, composição, tipo de revestimento, etc), fazem destas partículas candidatos promissores para estas aplicações [22][24]. Ao serem integradas em meio fisiológico, e submetidas a um campo magnético externo, as mNPs podem apresentar um comportamento idêntico a um agente de contraste de RM, podendo ser usadas como tal no melhoramento da qualidade das imagens [43]. Por outro lado, quando sujeitas a um campo magnético alternado, são capazes de libertar calor podendo deste modo integrar técnicas de terapia por aquecimento, como a hipertermia magnética. A especificidade destas duas abordagens pode ser facilmente mantida, uma vez que as NPs podem ser “guiadas” magneticamente a determinado tecido alvo para realizar a tarefa pretendida [44][45].

2.4.1 Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN), é uma técnica analítica bastante versátil, que permite obter informação estrutural e dinâmica da matéria, desde simples análises de compostos químicos, à obtenção de imagens do interior do corpo com bastante detalhe. Este método não invasivo, e que não faz uso de radiação ionizante, baseia-se nas propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos [46]. O núcleo de hidrogénio presente nas moléculas de água – maior constituinte do corpo humano (cerca de 70%) [47] – para além de existir em elevada abundância, apresenta determinadas características (nomeadamente o seu elevado momento magnético) que permitem obter uma elevada sensibilidade à técnica de RMN. Deste modo, apesar de existirem outros núcleos cujo comportamento magnético possa ser usado em imagens de RM, o hidrogénio é mais utilizado [43].

2.4.1.1 Princípios de funcionamento

O núcleo dos átomos é caracterizado por um número quântico de spin nuclear (I), que pode apresentar valores múltiplos de $\frac{1}{2}$. Como qualquer partícula fundamental, os núcleos de hidrogénio caracterizam-se por um movimento de rotação em torno de um eixo, sendo que segundo as leis da mecânica quântica, criam um campo magnético associado [48]. Este campo é habitualmente representado através do momento magnético μ [49]. É esta propriedade que faz com que este se comporte como um pequeno íman [50]. Na figura 2.9 podemos ver uma representação deste processo.

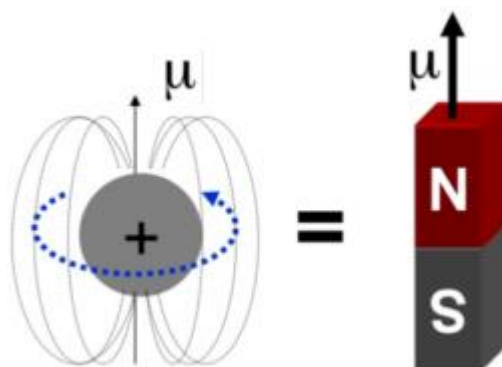


Figura 2.9 – Campo magnético gerado devido ao movimento de uma partícula carregada positivamente, com criação de um momento magnético μ . Comportamento idêntico a um pequeno ímã. Adaptado de [43]

Quando submetido a um campo magnético externo B_0 , estas partículas tendem a alinhar o seu eixo de rotação sobre a direção do campo, precessando a uma frequência conhecida por frequência de Larmor ω , que depende da natureza do núcleo considerado e da intensidade do campo magnético externo [49].

$$\omega = \gamma B_0 \quad \text{Equação 2.4}$$

onde γ representa a razão giromagnética que, no caso do hidrogénio, é de $2,7 \times 10^8 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$

Segundo o modelo quântico, para cada valor de I , existem apenas $2I+1$ orientações preferenciais de alinhamento deste dipolo magnético em relação a um campo magnético externo. No caso do hidrogénio, como apresenta $I = 1/2$, facilmente percebemos que este apenas pode ter duas orientações possíveis. Estas duas orientações representam os dois níveis de energia que cada próton pode ocupar, sendo o estado de menor energia chamado alinhamento paralelo e o de maior energia antiparalelo [43][49].

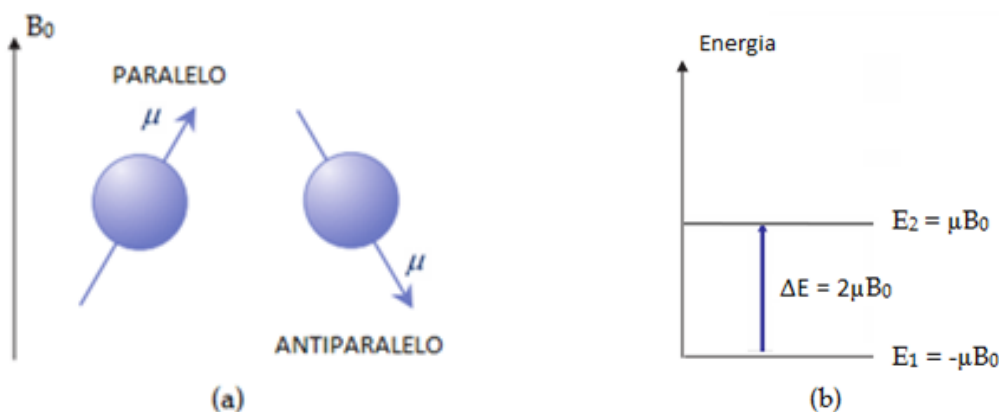


Figura 2.10 - Orientações possíveis dos átomos de hidrogénio quando aplicado um campo magnético externo (adaptado de [49]) (a) Nível de energia referente ao estado paralelo (E_1) e antiparalelo (E_2) (adaptado de [51]) (b).

A distribuição dos spins nestes dois níveis é regida pela equação de Boltzman (equação 2.5), [49], que relaciona a razão entre os número de spins orientados segundo cada estado, com uma exponencial dependente da diferença de energia dos estados e da temperatura.

$$\frac{N_p}{N_{ap}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} \quad \text{Equação 2.5}$$

N_p e N_{ap} representam, respetivamente, o número de spins alinhados paralelamente e antiparalelamente, k é a constante de Boltzman ($1,3805 \times 10^{-23}$ joules/Kelvin) e T a temperatura em Kelvin. Uma vez que o estado mais favorecido é o de menor energia (paralelo) [43][51], será produzida uma magnetização total positiva segundo o eixo zz , com uma amplitude M_0 [52].

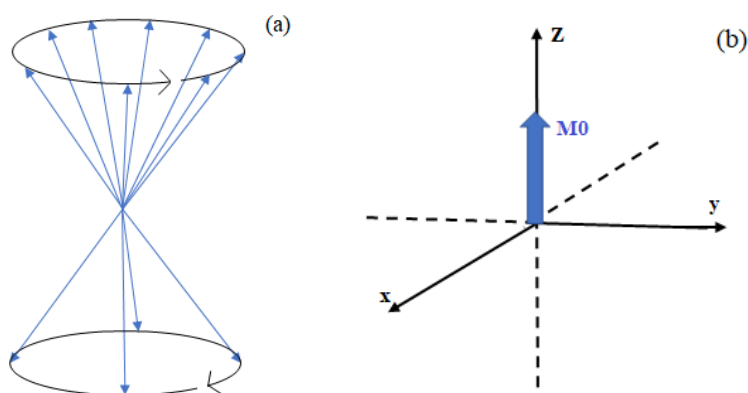


Figura 2.11 – Na representação da esquerda podemos ver os spins em movimento de precessão com uma população superior no estado paralelo (a). A ilustração da direita representa a magnetização total produzida (b). Adaptado de [43]

Na técnica de RMN, para além de aplicado um campo magnético externo, responsável por orientar os núcleos de hidrogénio, será também emitida uma sequência de pulsos de radiofrequência (RF). Quando a frequência do pulso coincide com a frequência de Larmor, ocorre uma mudança de orientação dos núcleos, segundo um determinado ângulo (*flip-angle*). Após esta aplicação, os núcleos tendem a retomar as suas posições de equilíbrio (processo designado por relaxação nuclear), emitindo o excesso de energia que será detetado. A radiação característica detetada origina um sinal chamado *Free Induction Decay* (FID), que após tratamento matematicamente apropriado, origina um espetro de sinal em função da frequência aplicada [46]. Na figura 2.12 está uma representação, bastante resumida, de todo este processo de aquisição de imagem por RMN.

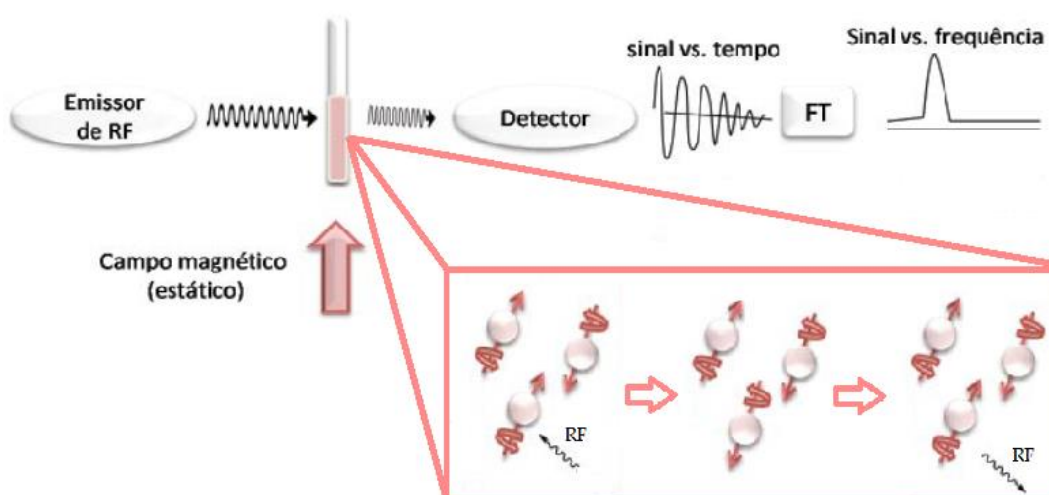


Figura 2.12 – Funcionamento a nível atômico de um sistema de RMN. Adaptado de [46].

Quando aplicado especificamente em imagiologia médica, os tecidos são sujeitos a um campo magnético com um gradiente calibrado, refletindo-se num sinal não apenas com informação sobre a quantidade e diversidade de prótons na amostra, mas também sobre a sua localização. Nesta técnica é assim possível obter um mapa tridimensional da densidade protónica visualizada em cortes [46].

Relativamente aos processos de relaxação, pode-se dizer que são causados pelas trocas de energia entre spins e destes com a vizinhança, que são designados por relaxação spin-spin e spin-rede, respetivamente. Nesta vertente foram criadas duas constante de tempo, T_1 e T_2 , que caracterizam cada um destes processos [43] e que são fortemente dependentes do tipo de tecido [53]. A relaxação longitudinal, ou spin-rede, é caracterizada pelo tempo de relaxação T_1 e quantifica o tempo necessário para que se recupere 63% do valor de M_0 ao longo do eixo dos zz (Figura 2.13 (a)). Em simultâneo com esta recuperação longitudinal temos a relaxação transversal, que consiste numa diminuição da magnetização no plano xy devido à interação entre spins. O tempo necessário para que esta magnetização se reduza a 37% do valor inicial é o T_2 (figura 2.13 (b)). Estas percentagens estão na origem das duas equações ilustradas na figura 2.13, uma vez que quando se iguala a varável “t” ao valor da constante de tempo (longitudinal ou transversal), resulta exatamente em $0,63 \times M_0$ para a recuperação longitudinal e $0,37 \times M_0$ para a transversal [53].

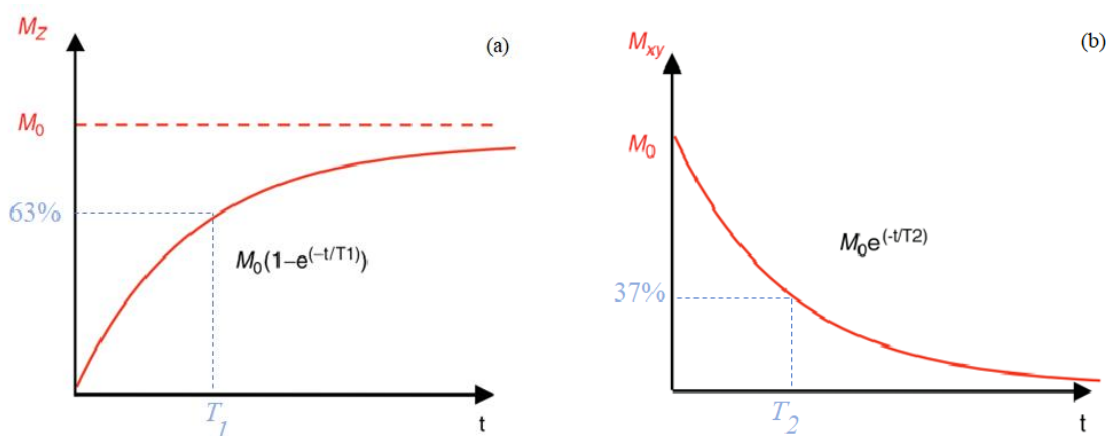


Figura 2.13 – Recuperação de M_z até M_0 segundo um exponencial, sendo T_1 a recuperação até 63% (a). Decaimento exponencial de M_{xy} até 0, sendo T_2 o tempo necessário para decrescer até 37% (b). Adaptado de [52]

Quando o tempo de desfaseamento dos spins, para além de considerar a interação entre estes, ainda tem em conta as heterogeneidades do campo magnético externo é chamado T_2^* [52], e relaciona-se com T_2 pela equação 2.6 [54]:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2(\Delta B_0)} \quad \text{Equação 2.6}$$

2.4.1.2 Agente de contraste

Em muitas situações clínicas, quando a diferença entre um ou mais tecidos não é suficiente para se obter o detalhe pretendido, é justificada a introdução de agentes de contraste (AC) no corpo do paciente. Estes agentes não geram sinais, apenas interferem com os tempos de relaxação T_1 e T_2 (reduzindo-os). Estas interferências resultam em alterações de intensidade nas imagens [43].

A eficiência de um AC pode ser quantificada pela relaxividade do sistema aquoso (s^{-1}), que corresponde à medida do aumento da taxa de relaxação por unidade de concentração do contraste [24] [49].

$$R_i = \frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i0}} + r_i C \quad \text{Equação 2.7}$$

Relativamente à equação 2.7, i pode tomar valores de 1 ou 2 (longitudinal ou transversal), T_{i0} é o tempo de relaxação antes de ser inserido o contraste, C a concentração de contraste (mmol L^{-1}) e r_i a relaxividade ($s^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$)

Quanto ao efeito que estes produzem numa imagem, podemos subdividir os AC em duas categorias – positivos ou negativos. Os primeiros aumentam a intensidade do sinal, afetando essencialmente T_1 , ao contrário dos contrastes negativos que diminuem a intensidade do sinal, afetando

predominantemente o tempo de relaxação T_2^* (e consequentemente T_2). São facilmente distinguíveis analisando a razão de r_2 e r_1 , que no caso dos positivos apresentam um valor reduzido e nos negativos um valor elevado [55] [56]

Atualmente os AC mais comuns são os complexos de Gadolínio (Gd), que devido ao seu comportamento paramagnético são capazes de alinhar levemente as linhas de campo, aumentando assim o campo magnético local. O íon gadolínio é tóxico, mas habitualmente é conjugado com um agente quelante que para além de eliminar a sua toxicidade (mantendo as suas propriedades paramagnéticas), permite que este seja eliminado via renal [43] [49]. Alguns exemplos já comercializados são Gd-DTPA (Magnevist[®]), Gd-(DTPA-BMA) (Omniscan[®]) e Gd-(HP-DO3A) (Prohance[®]), caracterizados por relaxividades na ordem dos 3,5-3,8 mM⁻¹s⁻¹ (20 MHz e 37°C). Estes complexos podem ainda ser conjugados, p.e. com dextrano, de forma a conferir uma maior estabilidade e biocompatibilidade ao composto. Estes complexos apresentam dimensões na ordem de 20 nm. [53].

O efeito predominante destes AC é o de aumentar o sinal de imagens ponderadas em T_1 [49], sendo habitualmente utilizado para diagnóstico de tumores cerebrais (Figura 2.14) e doenças vasculares [54]. Vários estudos foram realizados de forma a encontrar a dose ideal em prática clínica, sendo o mais recorrente de 0,1 mmol por quilograma de peso corporal [49]. Como contraindicação absoluta ao uso deste composto, podemos identificar a impossibilidade de ser utilizado por pacientes grávidas ou em amamentação, pois ao passarem na circulação fetal podem depositar-se (até ao final da gravidez) no líquido amniótico, bem como no leite materno (durante 24h após a administração) [49]. Outra situação inconveniente é a sua utilização em doentes com insuficiência renal, devido à excreção incompleta deste composto, que pode resultar no desacoplamento entre o quelante e o íon de gadolínio [53].

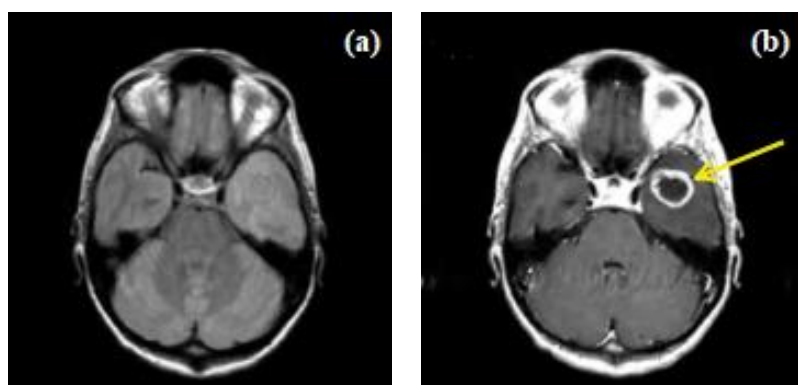


Figura 2.14 – Imagem de RM de tumor em cérebro humano sem (a) e com (b) contraste de gadolínio. Ocorre intensificação do sinal nas periferias do tecido maligno. Adaptado de [52].

Outro grupo de agentes de contraste que tem vindo a ser alvo de estudo, como uma outra abordagem, são as NPs baseadas em óxidos de ferro [54]. Alguns exemplos já comercializados são

Endorem[®], Rosevist[®], Sinerem[®] e Supravist[®], com revestimentos de dextrano ou carboxidextran para aumentar a biocompatibilidade [57]. Esta categoria de agentes de contraste, com dimensões habitualmente superiores aos complexos de gadolínio (entre 50 e 150 nm) [49], caracterizam-se por produzirem distúrbios no campo magnético local, numa proporção maior do que os agentes paramagnéticos [43][49]. Estas perturbações fazem com que ocorra um desfaseamento mais rápido dos prótons do meio envolvente, que se traduz numa relaxação mais rápida [57]. O seu comportamento é idêntico ao de contrastes negativos [52], exercendo um efeito predominante em imagens ponderadas em T_2 [43]. Doses muito elevadas não são úteis, uma vez que T_2 é bastante curto, sendo idealmente utilizado cerca 8-16 μmol de Fe kg^{-1} [49].

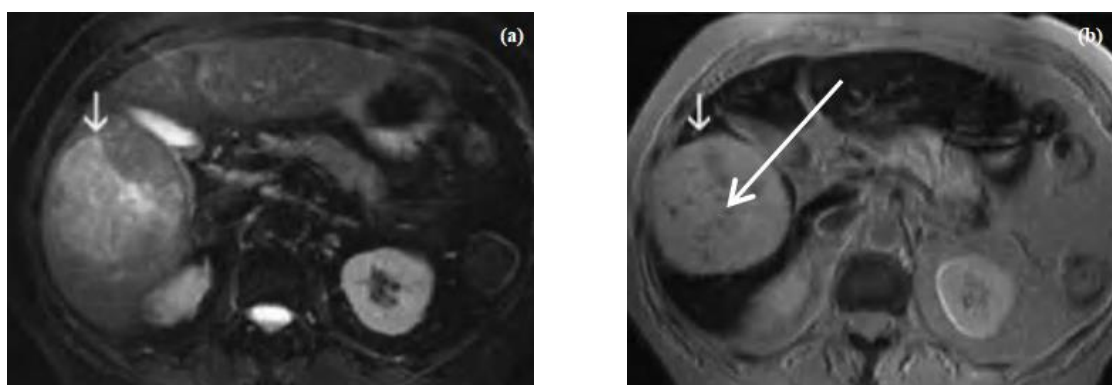


Figura 2.15 – Imagem de RM de fígado humano sem (a) e com (b) contraste à base IONPs. Tumores malignos no fígado não absorvem IONPs, ficando apenas o tecido saudável representado a escuro [52]

Quando estas partículas apresentam um diâmetro hidrodinâmico inferior a 50 nm, são chamadas de NPs de óxidos de ferro superparamagnéticas ultrapequenas (USPIOs) [52] e caracterizam-se por valores de $T_{1/2}$ relativamente superiores. Neste caso são apropriados para angiografias por RM [57]. Por outro lado, quando têm dimensões superiores (dentro dos limites do superparamagnetismo), são chamadas NPs de óxidos de ferro superparamagnéticas (SPIOs) [52] e caracterizam-se por valores de $T_{1/2}$ relativamente curtos. Neste caso são apropriados para imagens do fígado [57].

2.4.2 Hipertermia magnética

A hipertermia é um tipo de tratamento que pode ser aplicado no combate ao cancro, na qual se expõe determinado tecido corporal a elevadas temperaturas, habitualmente entre 40 e 44°C. Uma vez que células num ambiente com baixo pO₂ e pH (condições encontradas especificamente em tecidos tumorais), são mais sensíveis a diferenças de temperatura, este tratamento mostra-se uma terapia bastante promissora no combate a esta doença [58]. As primeiras referências a este tratamento remontam os tempos de Hipócrates, que propôs a cauterização de tumores superficiais por aplicação de ferro quente. Segundo ele, “Aqueles que não podem ser curados por medicamentos podem ser curados por

cirurgia. Aqueles que não podem ser curados por cirurgia, podem ser curados por hipertermia. Aqueles que não podem ser curados por hipertermia são de facto incuráveis” [59]. Atualmente já existem métodos mais sofisticados, sendo bastante recorrente a aplicação de radiação eletromagnética, como microondas, ultrassons e ondas de RF. No entanto estes mecanismos apresentam uma dificuldade em comum – aquecer localmente determinado tecido até uma temperatura específica. Estas limitações advêm maioritariamente devido à fraca penetração da radiação (no caso de tecidos mais profundos), rápida perda de energia com a profundidade e perturbações induzidas pela interface entre tecidos com ar ou osso [60]. Nesta vertente surgem as IONPs, em particular as de magnetite, na tentativa de superar estes obstáculos. Estas partículas com propriedades SPM podem ser “guiadas” por um campo magnético externo até tecidos específicos, sendo que quando submetidas a um campo magnético externo têm ainda a capacidade de produzir calor [44][45]. Esta dissipação de energia ocorre durante o processo de desmagnetização e resulta essencialmente de dois mecanismos distintos – relaxação de Néel e de Brown -, ilustrados na figura 2.16.

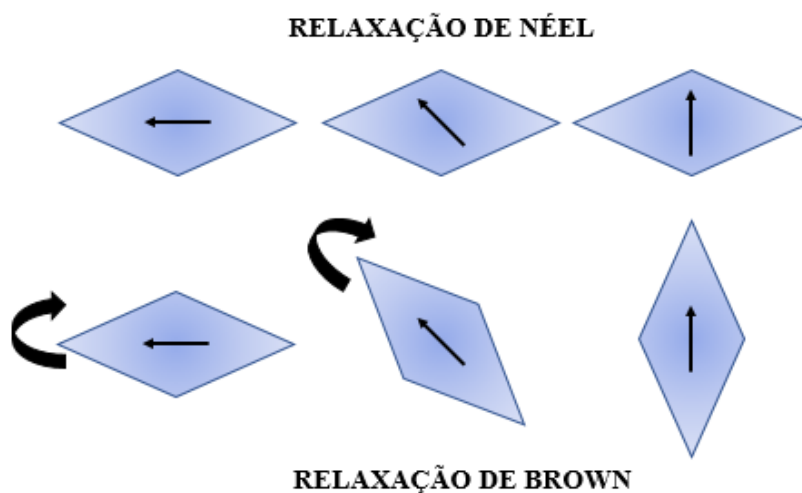


Figura 2.16 – Esquema ilustrativo dos processos de relaxação de Néel e de Brown. Baseado em [24]

Nestes processos de relaxação, a magnetização é orientada para uma posição de equilíbrio após a remoção do campo magnético externo. No mecanismo Browniano esta reorganização é acompanhada da rotação física da partícula, libertando energia resultante da fricção da mesma com o meio (depende da viscosidade do meio). No mecanismo de Néel esta dissipação resulta da rotação dos momentos magnéticos no interior das partículas, sem que estas se movam fisicamente. Cada um destes processos é caracterizado por um tempo de relaxação específico, sendo que no caso de partículas SPM fixas, apenas a relaxação de Néel está presente, uma vez que não é possível qualquer rotação física [61].

A eficácia deste aquecimento depende fortemente, da frequência de campo aplicada, bem como da própria essência das partículas (tamanho e microestrutura) [62]. Estas devem conter elevados valores de magnetização, bem como dimensões inferiores a 50 nm. Adicionalmente, é fundamental que a sua distribuição de tamanhos seja estreita, bem como a presença de um revestimento que lhes confira maior biocompatibilidade e evite a agregação das mesmas [63].

A taxa de absorção específica (SAR) é habitualmente usada como referência para caracterizar a performance das NPs nesta técnica. Estes valores podem definir-se como a geração de calor por massa de nanopartículas segundo a relação da equação 2.8 [64].

$$SAR = \frac{ms \times cp}{mnp} \times \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Equação 2.8}$$

onde ms é a massa da solução, cp a capacidade calorimétrica das NPs, mnp a massa de nanopartículas e $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ a variação máxima da temperatura em função do tempo. NPs com valores de SAR elevados são preferíveis por diminuírem a dose necessária para o tratamento [64].

A aplicação de diversos materiais magnéticos como meio de aquecimento localizado em tratamentos por hipertermia magnética, foi inicialmente experimentada por Gichrist e sua equipa em 1957, que recorrendo a partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (20 e 100 nm), testaram este efeito em gânglios linfáticos [65]. Desde então vários estudos foram levados a cabo nesta vertente, variando parâmetros como a força e frequência de campo, bem como os métodos de encapsulamento [61]. Jordan e sua equipa, evidenciaram com diversos tipos de nanopartículas de magnetite e de culturas celulares, que células malignas absorvem cerca de nove vezes mais partículas que as saudáveis [66]. Embora já tenham sido realizados testes com animais [61] e em culturas celulares cancerígenas [67], com resultados bastante promissores, a sua aplicação em humanos ainda é tomada como um desafio, uma vez que são exigidos campos magnéticos muito mais intensos que poderão prejudicar o organismo humano [68].

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta secção vão ser apresentados, de forma detalhada, todos os processos e técnicas de caracterização realizadas ao longo deste projeto.

3.1 SÍNTESE DE MNPs DE MAGNETITE

3.1.1 Precipitação química

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de precipitação química como descrito pela equipa de Gnanaprakash [69]. Este processo sofreu algumas adaptações, nomeadamente as temperaturas de síntese, que foram a 25°C, 50°C e 80°C. Com este estudo pretendia-se analisar o efeito da temperatura nas dimensões das NPs, tendo sido adicionado à montagem um banho de óleo.

3.1.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram os cloretos de ferro hexahidratado (*Sigma-Aldrich*) e tetra hidratado (*Sigma-Aldrich*), uma solução de NH_4OH a 25% (*Panreac*) e água ultrapura.

3.1.1.2 Procedimento

Inicialmente, os cloretos de ferro tetra e hexahidratados são dissolvidos em água ultrapura, mantendo uma proporção molar de 1:2 respetivamente. Para tal foram dissolvidos 2,5 mmol do primeiro composto e 5 mmol do segundo em 50 ml de água ultrapura, cada um e separadamente. A mistura resultante destas duas soluções (com uma razão molar de 1:2 de iões Fe^{2+} : Fe^{3+}), é colocada sobre agitação mecânica (aproximadamente 600 rpm) e em ambiente anaeróbio (inserindo N_2 gasoso), como ilustrado na figura 3.1.

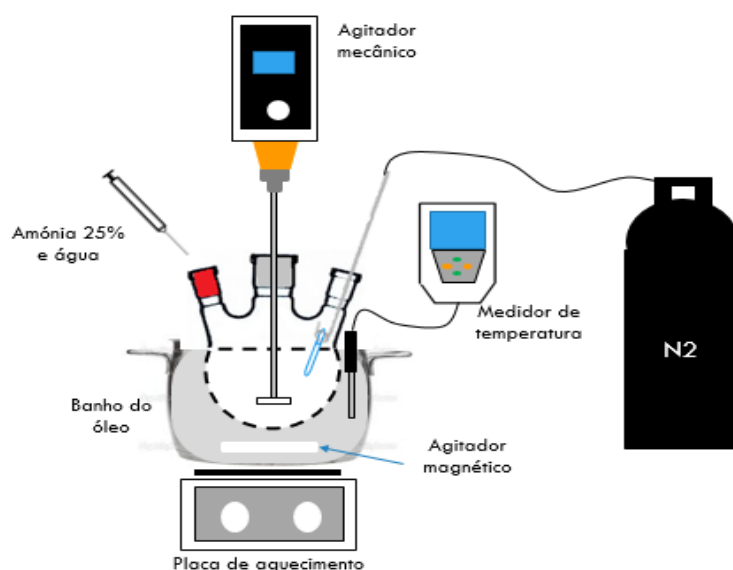


Figura 3.1 - Esquema de montagem utilizado na síntese por precipitação química

De forma a desencadear a reação, 10 mL de NH_4OH 25% são rapidamente adicionados à solução, ficando 5 min. sob agitação e nas condições já enunciadas. A reação é parada com a adição de aproximadamente 60 mL de água ionizada com uma seringa. São realizadas cerca de 3/4 lavagens com água ultrapura, recorrendo a um ímã para fazer separação magnética. No fim o pH deve ser ajustado com HCl diluído de forma a obter uma solução ligeiramente ácida.

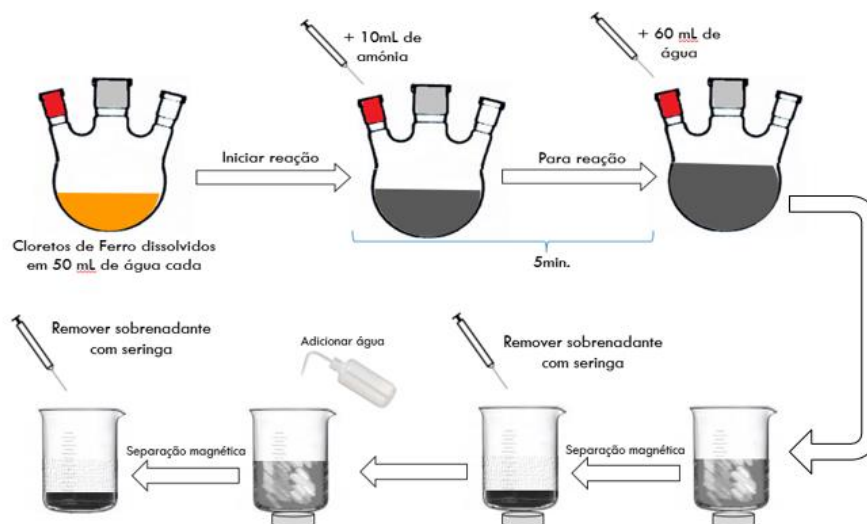


Figura 3.2 – Sequência de acontecimentos ao longo do procedimento

3.2 DETERMINAÇÃO DA [Fe]/[NPs] POR ESPETROSCOPIA DE UV-VIS

3.2.1 Método colorimétrico da fenantrolina

A concentração de NPs e/ou de ferro numa amostra, pode ser estimada recorrendo ao método colorimétrico da fenantrolina, adaptado do estudo de Talelli e sua equipa [70]. Este processo é bastante importante para calcular a quantidade de revestimento a utilizar nas nossas amostras, bem como para ajustar as diluições para posterior caracterização.

3.2.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram HCl concentrado 37% V/V (*Panreac*), HCl diluído 0,01 N, hidroxilamina (*Alfa aesar*) a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹, fenantrolina (*Applichem*) a 3 mg.mL⁻¹ e acetato de amónia (*Sigma Aldrich*) 0,5 M. As amostras foram diluídas em *eppendorfs* de 2 mL e as medições no espectrofotómetro foram realizadas em cuvets de quartzo. Todas as soluções referidas, foram preparadas utilizando como solvente HCl 0,01 N, à exceção deste último que foi previamente diluído em água ultrapura.

3.2.1.2 Procedimento

Inicialmente, foi deixado durante uma hora à temperatura ambiente, 40 µL de NPs previamente sintetizadas e dissolvidas em proporções adequadas (habitualmente 1:50, 1:100 e 1:250), juntamente com 20 µL de HCl 37% V/V. De seguida foram adicionados, por esta ordem, 100 µL de hidroxilamina, 500 µL de fenantrolina e 1140 µL de acetato de amónia (perfazendo um volume de 1800 µL). Foram feitas várias amostras nas mesmas condições (de 3 a 5), de forma a evitar erros inerentes a uma única leitura.

Por fim, recorrendo ao espectrofotómetro UV-VIS (*T90+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd*), procedeu-se à medição das absorvâncias das nossas amostras a 510 nm. Este valor permite-nos estimar a concentração de ferro, utilizando a reta de calibração representada pela equação 3.1:

$$\text{Abs} = 4,5079[\text{Fe}] + 0,0753 \quad \text{Equação 3.1}$$

sendo Abs a absorvância a 510 nm e [Fe] a concentração de ferro em mg/mL. Por outro lado, para obter a concentração de NPs basta usar a relação da equação 3.2:

$$[\text{Fe}] = 0,7 \times [\text{NPs}] \quad \text{Equação 3.2}$$

sendo [NPs] a concentração de nanopartículas em mg/mL. Esta relação foi ajustada experimentalmente, determinando a concentração de Fe segundo o procedimento descrito, e posterior liofilização e determinação da massa de NPs.

3.3 REVESTIMENTO DAS NPs COM DMSA

O DMSA foi escolhido como o primeiro revestimento a utilizar, não só com objetivo de aumentar a estabilidade das NPs de magnetite sintetizadas por precipitação química, mas também para funcionar como “interface” para o procedimento descrito em 3.4. Este procedimento foi adaptado dos trabalhos descritos por Fauconnier e Xie e suas equipas de investigação [71][72].

3.3.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram as NPs previamente sintetizadas, ácido nítrico 65% (*Panreac*), HCl 0,01 N (*Panreac*), NaOH 0,1 N (*eka*), água ultrapura e ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (*Aldrich*).

3.3.1.2 Procedimento

Para que este revestimento ocorra de forma eficiente, um conjunto de condições deve ser levado a cabo. O pH da solução de NPs deve estar compreendido entre 3 e 3,5, sendo este ajuste realizado pela adição de ácido nítrico 65% e caso necessário HCl 0,01 N (para baixar o pH). Uma solução de DMSA, previamente dissolvida em água ultrapura (volume final 10 mL), deve ser ajustada a um pH de 5,5 pela adição de NaOH 0,1 N. O número de moles utilizado deve estar em função da concentração de ferro das soluções utilizadas, sendo que o rácio utilizado foi de 3% do número de moles de ferro. Após estes ajustes, as soluções preparadas são colocadas num mesmo recipiente e mantidas em banho de ultrassons durante pelo menos 3 h.

3.4 FUNCIONALIZAÇÃO COM AMINOÁCIDO DE LISINA

As quantidades molares de cada reagente, bem como alguns passos do procedimento a seguir descrito, foram baseadas no procedimento utilizado na tese de Mestrado da Mariana Amaro [73], sendo que esta adaptou o procedimento descrito por Hermanson [74]. A quantidade de moles de lisina utilizada, foi tendo em conta que toda a amostra do procedimento 3.3 é revestida com DMSA, tendo sido utilizado um número de moles superior ao de DMSA. As quantidades utilizadas estão descritas no início do capítulo 4.

3.4.1 Materiais

Nanopartículas revestidas com DMSA (NPs@DMSA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (*Fluka*), N-Hidroxisuccinimida (NHS) (*Aldrich*), acetato de sódio (*Schorlau*) 500 Mm, tampão fosfato-salino (PBS).

3.4.2 Procedimento

Previamente são dissolvidos, em copos de precipitação distintos, 20 mg de EDC e 20 mg de NHS em 1 mL de acetato de sódio 500 mM cada um. Posteriormente é colocado sobre agitação mecânica, 8

mg de NPs@DMSA juntamente com a solução de EDC, durante 20 min (250 rpm). Passados estes 20 min é adicionada a solução de Sulfo-NHS e mantidas as condições anteriores, por mais 20 minutos. De seguida, foram realizadas duas lavagens com água ultrapura recorrendo à separação magnética. Por fim, ao produto resultante da segunda lavagem, deve ser adicionada uma solução contendo determinada quantidade lisina (especificada na tabela 4.3), dissolvido em 2 mL de PBS. A solução deve ser deixada sob agitação mecânica durante 18 h à temperatura ambiente, sendo no fim realizadas novamente duas lavagens, como descrito anteriormente.

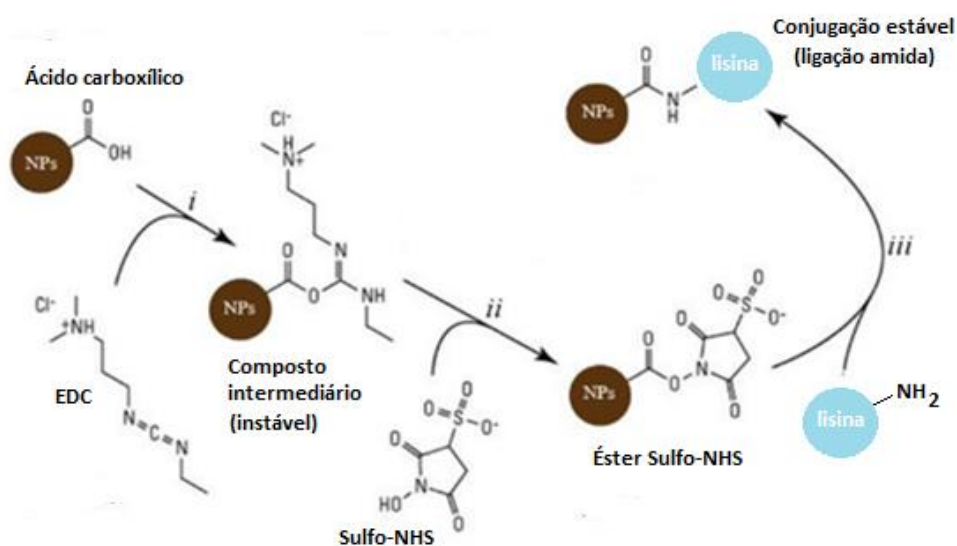


Figura 3.3 - Esquema adaptado da reação de funcionalização das NPs com a Lisina. Adaptado de [74].

3.5 CARACTERIZAÇÃO

3.5.1 Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Com esta técnica é possível inferir o tipo de ligações químicas presentes nas nanopartículas (com e sem revestimento), bem como a presença de determinados grupos funcionais, através da análise das bandas de absorção dos espectros, que vão corresponder às frequências de vibração de determinadas ligações.

Os espectros obtidos foram medidos recorrendo ao espectrofotómetro ATR-FTIR Nicolet 6700—Thermo Electron Corporation Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectrometer, para uma gama de comprimentos de onda compreendidos entre 4000 e 480 cm⁻¹ e um ângulo de incidência de 45°. Note-se que para esta caracterização, foi necessária uma prévia liofilização da amostra.

3.5.2 Difração de Raio-X (DRX)

Esta técnica foi importante para averiguar a estrutura cristalina das nanopartículas, mais precisamente o seu rearranjo espacial. No caso das NPs sem revestimento serviu para verificar se estas eram maioritariamente constituídas por magnetite ou magmiste, tendo tido ainda um papel importante numa análise posterior ao revestimento, para verificar possíveis alterações estruturais. O difratómetro de raio-X utilizado foi o *X'Pert PRO PANalytical*, com um intervalo de 2θ de 0,033 (compreendido entre os 15° e os 80°), recorrendo a radiação Cu-Ka ($k = 1.54060 \text{ \AA}$). Note-se que para esta caracterização, foi necessária uma prévia liofilização da amostra.

3.5.3 Difração dinâmica da luz (DLS)

Esta técnica foi utilizada para estimar o tamanho hidrodinâmico (D_H) das nanopartículas sintetizadas com e sem revestimento, tendo a particularidade de avaliar possíveis modificações causadas pelo revestimento nas propriedades das NPs, nomeadamente na sua estabilidade. O equipamento utilizado foi o *SZ-100 nanopartica series (Horiba, Lda)*, com um laser de 532 nm. As medições realizadas foram efetuadas para um ângulo de dispersão de 90° e as células utilizadas eram de plástico descartáveis.

3.5.4 Magnetização

As medições de magnetização foram efetuadas num magnetómetro *cryogenic-cryofree* 10 T VSM, tendo sido registadas as curvas de histerese a 5 e 300 K no campo magnético até 2 T.

3.5.5 Hipertermia magnética

Esta técnica permitiu medir o aumento da temperatura das NPs funcionalizadas, quando aplicado um campo magnético alternado, devido à vibração das mesmas. Para tal recorreu-se ao equipamento *DM100 series da Nb Nanoscale Biomagnetics*, capaz de realizar medições para intensidades de campo até 24 kA.m^{-1} . Foi aplicado a 1 mL de amostra de mNPs previamente sintetizadas e revestidas, um campo magnético alternado para a uma frequência de 418.5 kHz, em ensaios com a duração de 10 minutos.

3.5.6 Relaxometria por RMN

Esta técnica permitiu medir os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) através da aplicação de uma sequência de pulsos específica, respetivamente, *Inversion-recovery* e *Carr Purcell Meiboom Gill*. As medições foram realizadas no espectrómetro *Bruker Avance III NMR* de 7,2 T a 36°C (temperatura corporal) utilizando uma sonda de líquidos $^{13}\text{C}/^1\text{H}/^2\text{H}$ 5 mm *dual probe* (VT), para as medidas dos tempos de relaxação longitudinal utilizou-se uma sequência de pulso *inversion-recovery* e

para a relaxação transversal a sequência de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (cpmg). A concentração de ferro das amostras estava compreendida entre 0,4 e 3,2 mM.

3.5.7 Imagem por RMN

As imagens obtidas por esta técnica, foram adquiridas recorrendo ao espectrómetro *Bruker Avance III NMR de 7.2 T*, com uma unidade de gradientes GRASP IIP e amplificadores de 60A – 1500G/cm de potência, segundo uma sonda de imagem *PH Micro 2.5* com um *insert* de ^1H . As medidas foram realizadas à temperatura corporal (36° C), e as amostras foram previamente dissolvidas em ágar 0,5% (m/m), para concentrações de ferro compreendidas entre 3,2 e 0,4 mM. A sequência utilizada foi *mic_flash_8sl*, tempo de repetição de 1000 ms, tempo de eco de 2,3 ms, *flip angle* de 30°, matriz de 256x256 e campo de visão de 3,02 cm para as duas amostras. Relativamente ao tempo de aquisição, foram testadas experiências de 34min8s e de 2h16min para as NPs@DMSA e de 2h16min para as NPs@DMSA@Lys

3.5.8 Microscopia Eletrónica de Transmissão

Através desta análise, é possível obter imagens que nos permitem avaliar o tamanho e morfologia das NPs de magnetite. O equipamento de emissão termiônica e resolução ponto a ponto de 2,7 Å, é o *Hitachi H-8100 II* e os ensaios são realizados no Instituto Superior Técnico. As amostras encontram-se em suspensão de água ultrapura e são previamente colocadas numa rede de carbono.

3.5.9 Ensaios de citotoxicidade

Estes ensaios permitiram estudar a viabilidade celular em linhas Vero e SaOs-2 recorrendo ao teste da resazurina. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade celular de aproximadamente $19,6 \times 10^4$ células/mL. No caso das células Vero, foram previamente cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com a adição de 10% de soro bovino fetal, 0,5% de penicilina-estreptomicina (10000 U.mL^{-1}), piruvato de sódio (100 mM) e Glu-taMAX™. Por outro lado, as células SaOs-2 foram cultivadas em meio McCoy 5A, com a adição de 10% de soro bovino fetal e 0,5% de Penicilina-estreptomicina (10000 U.mL^{-1}). Posteriormente, as culturas, foram incubadas a 37°C num ambiente de 5% de CO₂ durante a noite, sendo no dia seguinte adicionado meio fresco com as NPs em estudo em concentrações conhecidas (variando de 500 µg/mL até 31,25 µg/mL). Após incubação de 48h, o meio foi removido e a resazurina adicionada a cada um dos poços. Passadas 3h de incubação, foram medidas as absorvâncias em cada um dos poços a 570 e 600 nm. Estes valores permitiram calcular a viabilidade celular relativa, tendo em conta os poços de controlo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção vão ser apresentados e discutidos, todos os resultados obtidos ao longo deste projeto. Os subcapítulos foram divididos por técnicas de caracterização – DLS, DRX, FTIR, TEM, Magnetização, relaxometria por RMN, Hipertermia magnética e citotoxicidade. Para melhor compreensão das reações ocorridas durante o decorrer do trabalho, foram organizadas nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 os resumos de todas estas, com algumas condições que diferem entre elas.

Tabela 4.1 – Resumo das sínteses por precipitação química (PQ) realizadas

| CONDIÇÕES REACIONAIS | PQ1 | PQ2 | PQ3 | PQ4 | PQ5 | PQ6 | PQ7 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|
| Temperatura (°C) | 25 | 50 | 80 | 55 | 55 | 55 | 55 |
| Velocidade (rpm) | 700 | 700 | 700 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| V_{final} (mL) | 150 | 150 | 150 | 80 | 150 | 100 | 100 |
| [NPs]_{final} (mg.mL⁻¹) | 3,75 | 3,62 | 3,36 | 5,99 | 3,35 | 6,59 | 5,26 |
| pH_{final} | 9,52 | 9,75 | 9,41 | 9,40 | 9,42 | 9,63 | 9,54 |

Tabela 4.2 – Resumo dos revestimentos com DMSA (RD) realizados

| CONDIÇÕES REACIONAIS | RD1 | RD2 | RD3 |
|---|------|------|------|
| Tempo em ultrassons | 2h | 3h | 3h |
| V_{final} (mL) | 10 | 10 | 13 |
| [NPs]_{final} (mg.mL⁻¹) | 2,64 | 4,94 | 3,76 |
| NPs utilizada | PQ5 | PQ6 | PQ7 |
| pH_{final} | 6,91 | 7,13 | 7,04 |

Tabela 4.3 - Resumo das funcionalizações com Lisina (FL) realizados

| CONDIÇÕES REACIONAIS | FL1 | FL2 | FL3 | FL4 | FL5 |
|---|------|------|------|------|------|
| NPs@DMSA utilizada | RD1 | RD2 | RD3 | RD3 | RD3 |
| [NPs] _{final} (mg.mL ⁻¹) | 1,09 | 2,37 | 2,68 | 1,85 | 3,13 |
| pH _{final} | 7,11 | 6,70 | 7,10 | 6,99 | 7,07 |
| M _{lisina} (mg) | 2,0 | 7,5 | 7,5 | 25,0 | 30,0 |

4.1 DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura e do revestimento, no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas sintetizadas, foram realizados ensaios de DLS com amostras de NPs de Fe₃O₄, revestidas com DMSA e funcionalizadas com Lisina.

Nesta técnica é medida a intensidade da luz dispersa em função do tempo, quando um laser incide sobre as partículas que se encontram sujeitas a movimento browniano. A variação desta intensidade é sensível ao tamanho das partículas, traduzindo-se numa função de autocorrelação medida pelo equipamento [75][76]. Na figura 4.1 estão representadas algumas destas curvas para diferentes concentrações de ferro.

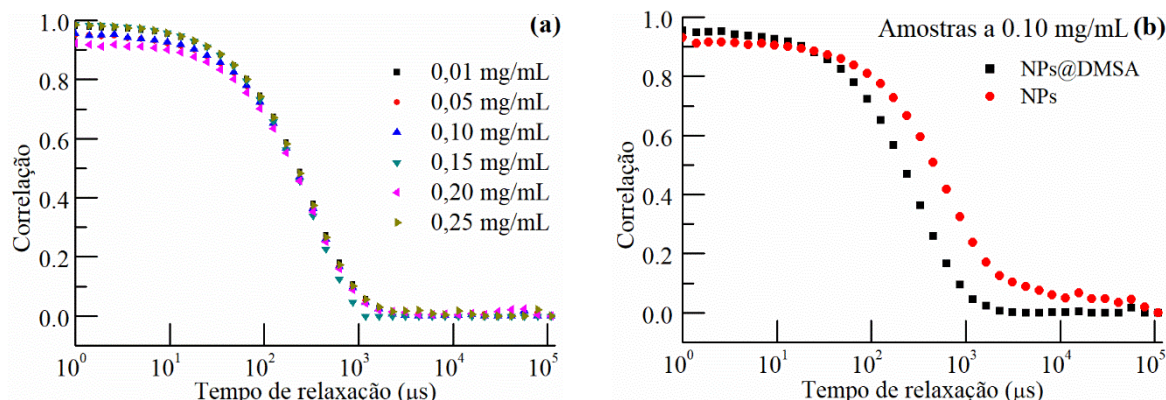


Figura 4.1 – Curvas de autocorrelação (a) de NPs@DMSA para diferentes concentrações de ferro e (b) para a uma mesma concentração amostras de NPs sem revestimento e revestidas com DMSA.

Estas curvas, representadas por um decaimento exponencial, permitem-nos tirar algumas conclusões visualizando apenas o seu comportamento matemático. Quanto mais acentuado o decaimento, mais monodispersas são as amostras e menores as dimensões das NPs [76]. Nas curvas (a) da figura 4.1 podemos ver que as amostras aparentam ser monodispersas, devido ao declive acentuado. Por outro lado, em (b) a curva referente às NPs sem revestimento, já aparenta conter partículas de maiores dimensões. Este acontecimento pode ser explicado pelo facto de as medições de DLS serem

realizadas um dia após a síntese das nanopartículas, o que na ausência de revestimento, é o suficiente para que estas se agreguem.

No entanto estas informações, por si só, não fornecem o real diâmetro hidrodinâmico das NPs presentes na amostra, sendo necessária uma análise mais detalhada. Para tal foi utilizado um algoritmo que se baseia no ajuste de uma curva de autocorrelação teórica às curvas experimentais obtidas. Deste ajuste resultou uma constante de decaimento τ , que permitiu calcular o coeficiente de difusão D e no seguimento os diâmetros hidrodinâmicos médios (D_h) através da equação de Stokes-Einstein, representada na equação 4.1 [76]:

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do fluido e D o coeficiente de difusão. Nestas experiências considerou-se T igual a 289,15 K e a viscosidade da água 0,89 mPa.s. Para além deste valor, outro parâmetro que é importante registar, é o parâmetro de largura conhecido como índice de polidispersão (PI). Este valor deve ser inferior a 0,7 para que a distribuição de tamanho na amostra seja apropriada para a técnica de DLS e inferiores a 0,2 para a amostra ser considerada monodispersa. Caso a amostra apresente alguma polidispersabilidade, serão extraídos dois valores de diâmetros hidrodinâmicos médios – D_1 e D_2 – como sendo os mais prováveis de encontrar na amostra.

De forma a estudar o efeito da temperatura no diâmetro das NPs, foram realizados testes de DLS em amostras resultantes das sínteses PQ1, PQ2 e PQ3 (respetivamente a 25°C, 50°C e 80°C). Os resultados foram pouco conclusivos quanto às reais dimensões das NPs, uma vez que estas exibem tendência natural para se agregarem. Na figura 4.2 podemos ver os tamanhos médios encontrados nestas amostras, bem como os respetivos PIs.

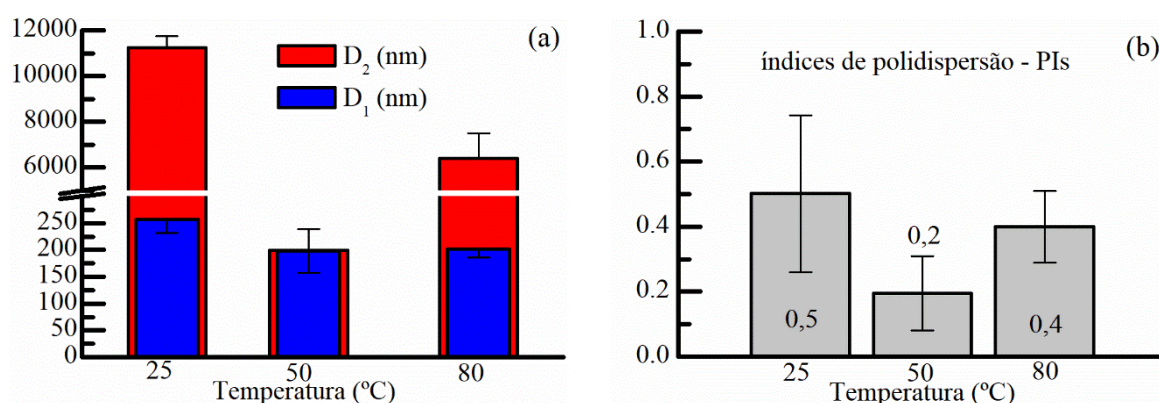


Figura 4.2 – (a) Diâmetros hidrodinâmicos pequenos (D_1) e grandes (D_2) e respetivos índices de polidispersão (b), de NPs sem revestimento sintetizadas por precipitação química a 25°C, 50°C e 80°C.

Estes resultados sugerem que a 50°C são sintetizadas NPs com menores diâmetros hidrodinâmicos, caracterizadas por menores índices de polidispersão. É de realçar ainda, que apenas para esta temperatura se verificou uma homogeneidade de tamanhos (sem grandes agregados), confirmado pelo valor médio dos PIs que se encontra exatamente na fronteira entre a polidispersabilidade e a monodispersabilidade. Estes resultados vieram confirmar o que foi descrito na literatura [26], tendo sido por isso adotada esta temperatura como a indicada para obter NPs de menores dimensões e polidispersabilidade.

Relativamente ao revestimento com DMSA, espera-se que este não permita a formação de grandes agregados e elevados PIs, como os apresentados anteriormente. Na tabela 4.4 estão representados os valores calculados dos diâmetros hidrodinâmicos das NPs resultantes de RD2, em função da sua concentração em solução, bem como os respetivos índices de polidispersão.

Tabela 4.4 – Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos (D_1 e D_2) e respetivos índices de polidispersão em função da concentração de NPs. Dados relativos a amostras de NPs@DMSA

| [NPs] (mg.mL ⁻¹) | D_1 (nm) | D_2 (nm) | PI |
|------------------------------|------------|------------|-------------|
| 0,01 | 148 ± 18 | 375 ± 50 | 0,32 ± 0,07 |
| 0,05 | 137 ± 26 | 255 ± 63 | 0,18 ± 0,06 |
| 0,10 | 139 ± 24 | 252 ± 58 | 0,22 ± 0,06 |
| 0,15 | 136 ± 20 | 261 ± 35 | 0,24 ± 0,06 |
| 0,20 | 142 ± 22 | 250 ± 65 | 0,20 ± 0,06 |
| 0,25 | 146 ± 11 | - | 0,25 ± 0,10 |

Estes resultados sugerem a existência de dois diâmetros (D_1 e D_2) para cada concentração, retratando amostras maioritariamente constituídas por estas duas dimensões. Este facto deve-se provavelmente à existência de NPs em diferentes estados de agregação, ou seja, os diâmetros maiores corresponderão a aglomerados de partículas e os diâmetros mais pequenos a partículas praticamente isoladas. Apenas para a concentração de 0,25 mg.mL⁻¹ é que as amostras evidenciaram a existência de um único grupo de partículas com diâmetros de aproximadamente 145 nm, para o menor desvio-padrão. Estas evidencias, bem como a proximidade aos restantes diâmetros pequenos, permitem aproximar o diâmetro destas partículas a este valor. Uma vez que os valores de PI se encontram próximos do limite de monodispersabilidade, podemos considerar que as amostras são apenas ligeiramente polidispersas, facto evidenciado pela existência dos dois diâmetros já referidos. Foi ainda realizada uma nova análise de DLS com outras amostras de NPs@DMSA (RD3), desta vez com um maior tempo de permanência

em banho de ultrassons (3 h). Comparativamente aos diâmetros hidrodinâmicos anteriores, foi possível evidenciar uma ligeira redução dos mesmos, como ilustrado na figura 4.3.

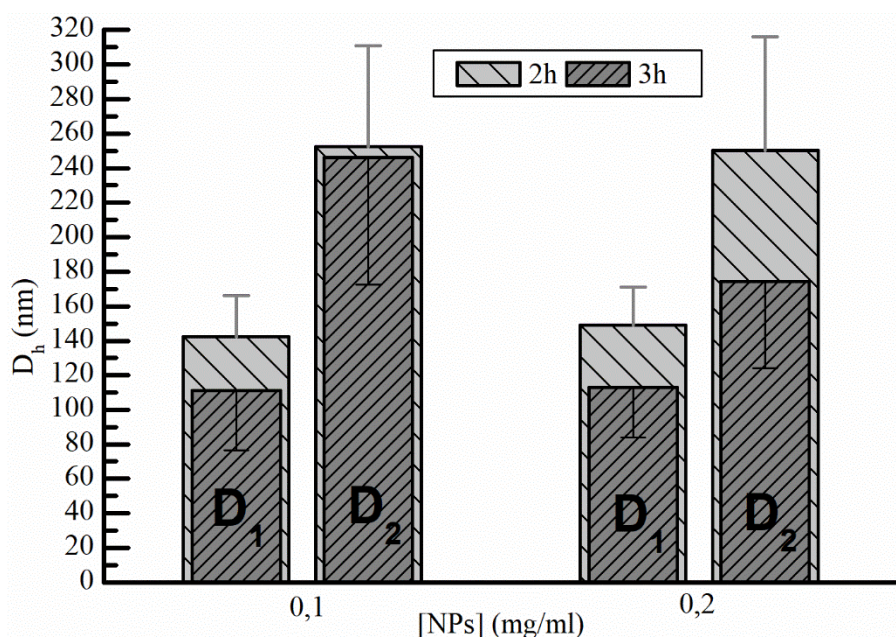


Figura 4.3 – Diâmetros hidrodinâmicos pequenos (D_1) e grandes (D_2) de NPs@DMSA com 2h e 3h em banho de ultrassons.

Relativamente às NPs@DMSA@Lys, é de esperar que os seus diâmetros hidrodinâmicos sejam superiores aos das NPs@DMSA que lhes serviram como base, pelo facto de se adicionar mais um componente ao revestimento. Na tabela 4.5 estão representados os dados referentes aos dois compostos em questão.

Tabela 4.5 - Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos e respetivos índices de polidispersão em função da concentração de NPs. Dados relativos a amostras de NPs@DMSA e de NPs@DMSA@Lys

| [NPs] (mg.mL ⁻¹) | Amostra | D1 (nm) | D2 (nm) | PI |
|------------------------------|---------|----------|-----------|-------------|
| 0,10 | RD3 | 111 ± 34 | 246 ± 73 | 0,26 ± 0,04 |
| | FL2 | 140 ± 21 | 269 ± 106 | 0,17 ± 0,07 |
| 0,20 | RD3 | 113 ± 29 | 174 ± 50 | 0,23 ± 0,03 |
| | FL2 | 138 ± 13 | 270 ± 173 | 0,22 ± 0,02 |

Numa primeira análise é validada a hipótese supracitada, confirmando que os diâmetros hidrodinâmicos das NPs@DMSA@Lys (FL2) são efetivamente superiores às NPs precursoras (RD3). Relativamente aos valores dos índices de polidispersão foi verificada uma ligeira redução, indicando que possivelmente as amostras são mais monodispersas. Efetivamente quando realizado o tratamento de dados, para o caso das amostras de NPs@DMSA@Lys, os diâmetros D_2 eram praticamente

inexistentes, sendo por isso as amostras constituídas maioritariamente por apenas uma dimensão (D_1). Em suma, foi registada uma ligeira redução da polidispersabilidade com a adição da lisina, sendo que os diâmetros hidrodinâmicos médios para os dois grupos de partículas, foram de aproximadamente 110 nm para as NPs@DMSA e de 140 nm para as NPs@DMSA@Lys.

4.2 DIFRAÇÃO POR RAIOS X

Através da análise dos espectros de DRX, foi possível tirar algumas conclusões quanto à influência da temperatura de síntese e do revestimento, na estrutura cristalina das NPs. Para tal foram selecionadas 5 amostras distintas, sendo 4 referentes aos óxidos de ferro resultantes de PQ1, PQ2, PQ3 e PQ4, e uma última amostra de NPs@DMSA resultante de RD1. Nas figuras 4.4 e 4.5 podemos ver os gráficos resultantes, após tratamento de dados adequado, tendo estes sido comparados com os padrões teóricos da magnetite (JCPDS 00-019-0629) e magmíte (JCPDS 00-039-1346). Na tabela 7.1 em anexo, estão os picos característicos destes dois tipos de óxidos de ferro, com as respetivas intensidades em função de 2θ .

Analisando primeiro o efeito da temperatura de síntese, facilmente identificamos em todos os gráficos os seis picos característicos de 2θ , correspondentes aos planos de difração (220), (311), (400), (422), (511) e (440):

- ✓ PQ1 => 30,25 | 35,48 | 43,26 | 53,72 | 57,17 | 62,77;
- ✓ PQ2 => 30,12 | 35,52 | 43,33 | 53,44 | 57,20 | 62,84;
- ✓ PQ3 => 30,17 | 35,59 | 43,04 | 53,52 | 57,22 | 62,64;
- ✓ PQ4 => 30,09 | 35,45 | 43,13 | 53,53 | 57,18 | 62,73.

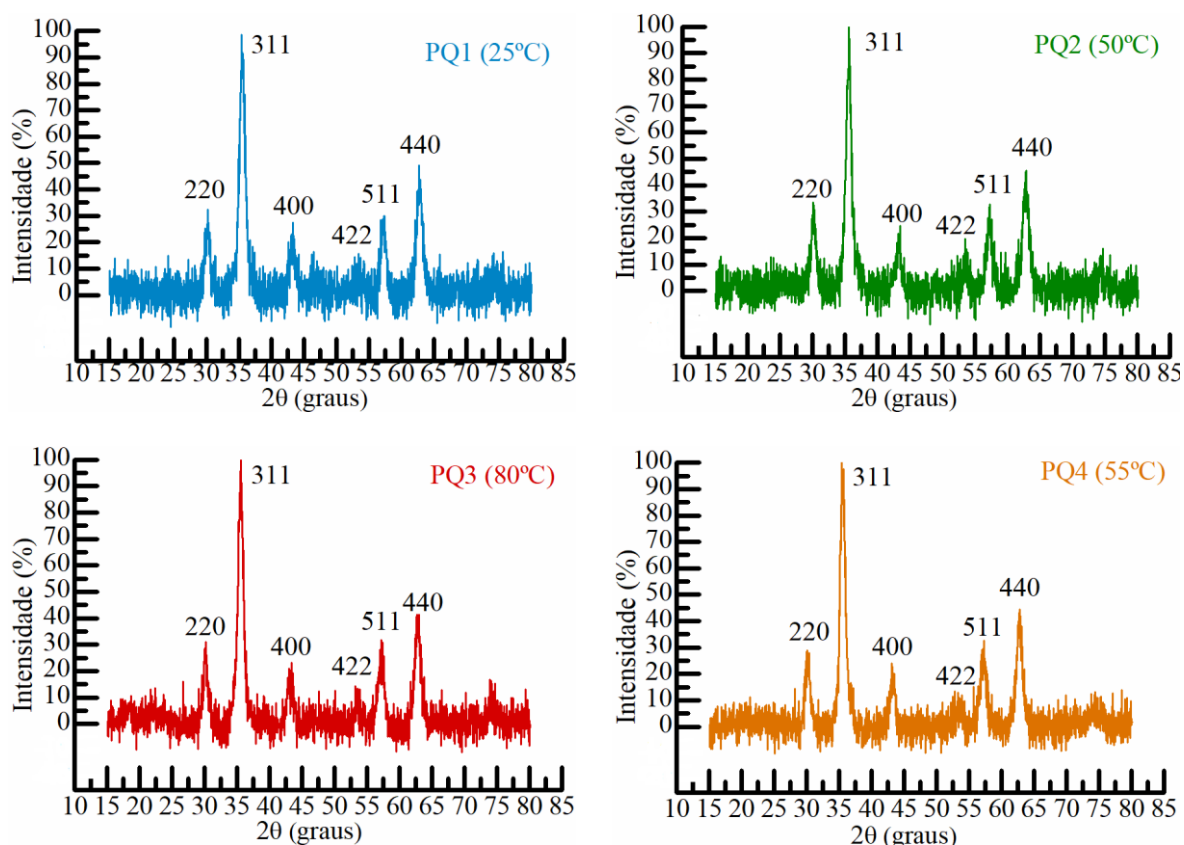


Figura 4.4 – Espectros de DRX de NPs de magnetite sintetizadas a diferentes temperaturas.

Embora estes planos estejam presentes em ambas as configurações estruturais (com oscilações angulares praticamente inexistentes), este critério isolado, é insuficiente para inferir sobre a maior/menor percentagem de magnetite/magmite nos compostos. Para tal foi necessário analisar as intensidades de determinados picos, mais precisamente os picos correspondentes aos planos (220), (400) e (511). Como podemos verificar pelos dados da tabela 7.1 em anexo, a diferença entre o pico (220) e (400) é de apenas 10% no caso da magnetite e de aproximadamente 20% no caso da magmite. Outro critério a ter em conta, reside no facto dos picos (220) e (511) apresentarem a mesma intensidade na magnetite, e de diferirem aproximadamente 10% na magmite. Embora as condições da magnetite tenham sido confirmadas, não podemos negar a inexistência de magmite, pelo que apenas é correto afirmar que as amostras são maioritariamente constituídas por magnetite.

Relativamente ao efeito do revestimento (DMSA), verificou-se que este não alterou a estrutura cristalina, tendo-se identificado os mesmos 6 picos característicos – 30,32 | 35,53 | 43,19 | 53,73 | 57,21 | 62,68 –, bem como as condições relativas à magnetite.

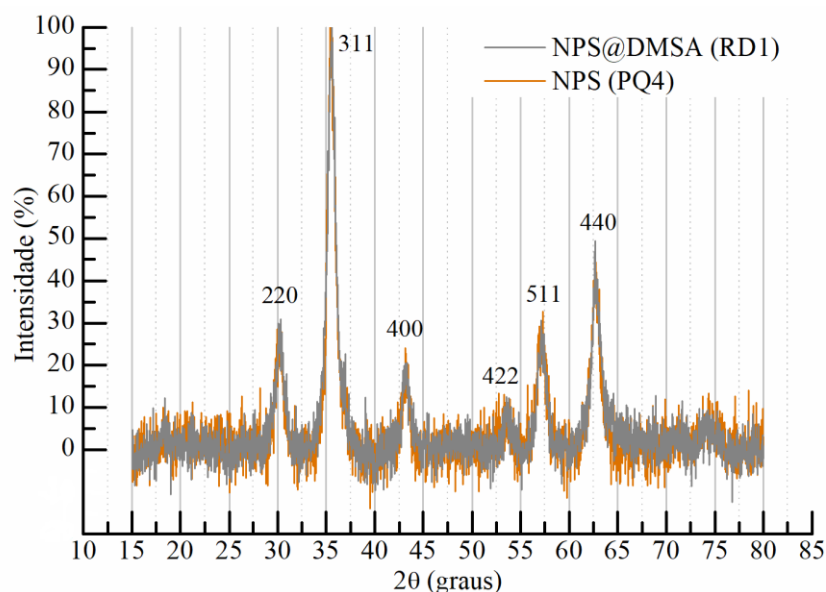


Figura 4.5 – Espectro de DRX de NPs de magnetite (PQ4) e de NPs@DMSA (RD1)

Por último foram calculados os diâmetros médios de cristalite das amostras aqui referidas, tendo sido para este efeito, aplicada a equação de Scherrer, apresentada na equação 4.2:

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Equação 4.2}$$

onde k uma constante que varia em função da forma das partículas (nesta caso 0,94), λ o comprimento de onda da radiação incidente (0,1540598), β a largura a meia altura do pico mais intenso e θ o ângulo de difração [77]. Os valores foram retirados manualmente de cada um dos gráficos, obtendo-se os seguintes diâmetros:

- ✓ PQ1: $\theta = 17,74^\circ$ (0,31 rad) e $\beta = 0,93^\circ$ (0,016 rad) $\Rightarrow D = 9,50$ nm;
- ✓ PQ2: $\theta = 17,76^\circ$ (0,31 rad) e $\beta = 0,83^\circ$ (0,014 rad) $\Rightarrow D = 10,86$ nm;
- ✓ PQ3: $\theta = 17,80^\circ$ (0,31 rad) e $\beta = 0,95^\circ$ (0,017 rad) $\Rightarrow D = 8,95$ nm;
- ✓ PQ4: $\theta = 17,73^\circ$ (0,31 rad) e $\beta = 0,97^\circ$ (0,017 rad) $\Rightarrow D = 8,94$ nm;
- ✓ RD1: $\theta = 17,77^\circ$ (0,31 rad) e $\beta = 0,88^\circ$ (0,015 rad) $\Rightarrow D = 10,14$ nm.

É possível evidenciar que estes valores não oscilaram muito, estando compreendidos entre 8,94 e 10,86 nm. Todo o conjunto de análises efetuadas neste subcapítulo, confirmaram que tanto a temperatura de síntese como o revestimento de DMSA, não afetaram a estrutura cristalina das NPs sintetizadas.

4.3 ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Foram realizadas várias análises por FTIR, de forma a confirmar a ligação dos diversos surfactantes, mais especificamente do DMSA à superfície das NPs e da Lisina às NPs@DMSA. Uma

vez que este processo pode tornar-se por vezes um pouco complexo, devido à sobreposição de bandas, foi adotada a estratégia de analisar passo a passo os espectros, ou seja, para cada amostra analisada existe um espectro de referência do composto que lhe serviu como ponto de partida, bem como do reagente adicionado no seu estado puro e/ou do composto pretendido. Para tal foram analisadas 3 grupos de amostras – NPs (de Fe_3O_4), NPs@DMSA e NP@DMSA@Lys.

No primeiro grupo foram analisados os espectros para 4 temperaturas de síntese (figura 4.6) – 25°C, 50°C, 80°C e 55°C – referentes às sínteses PQ1, PQ2, PQ3 e PQ4, respetivamente. Em todos eles, foram identificadas bandas de absorção referentes ao modo de vibração de estiramento da ligação Fe-O (a 560 cm^{-1}) e estiramento de O-H (a 1630 cm^{-1}). Foi possível ainda identificar uma banda larga entre 3000 e 3500 cm^{-1} , que está relacionada com o estiramento de O-H devido ao vapor de água presente na amostra [78]. Não foi possível identificar diferenças significativas nestes resultados, pelo que podemos concluir que a temperatura não alterou a configuração do produto final.

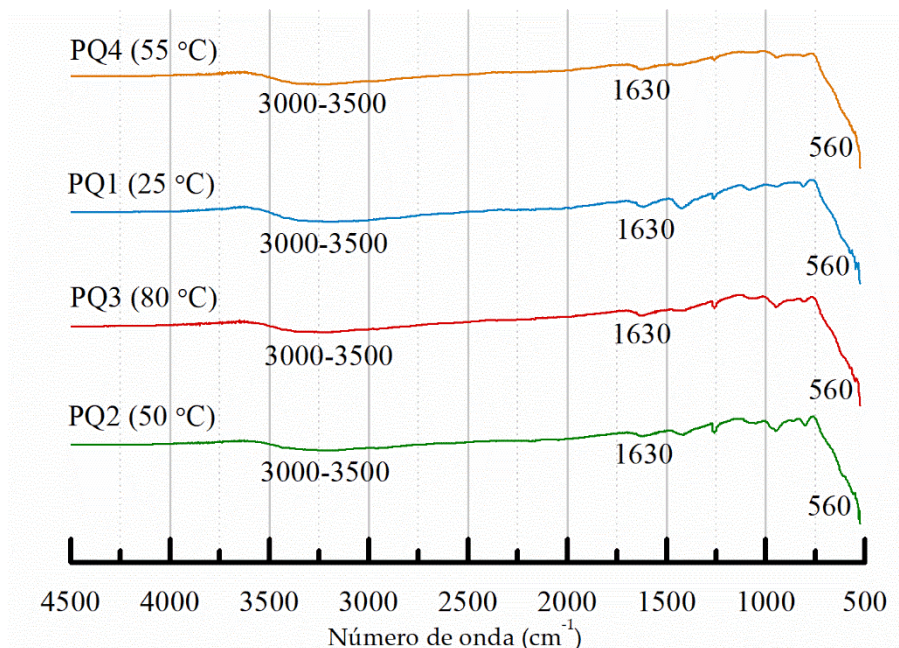


Figura 4.6 – Espectros de FTIR referentes às NPs resultantes das sínteses PQ1 (25°C), PQ2 (50°C), PQ3 (80°C) e PQ4 (55°C).

Relativamente à compreensão do mecanismo de ligação do DMSA à superfície das NPs de Fe_3O_4 , foi necessário comparar o espectro obtido com outros propostos teoricamente pela literatura. Na figura 4.7, foi ainda colocado como referência o espectro de NPs de magnetite referente a PQ4, de forma a identificar qual o conjunto de bandas presentes em ambas as amostras. Existe um conjunto de bandas, nomeadamente as que correspondem aos números de onda 560 e 3200 cm^{-1} , já identificadas como modos de vibração presentes nas moléculas de Fe_3O_4 . A ligação do DMSA à superfície das NPs foi evidenciada

pelas bandas referentes aos modos de vibração de estiramento assimétrico e simétrico do grupo carbonilo, representados respectivamente pelos números de onda de 1560 e 1346 cm^{-1} . Estas bandas sofreram um deslocamento quando comparadas com as vibrações em DMSA livre à volta dos 1700 cm^{-1} [73] [79].

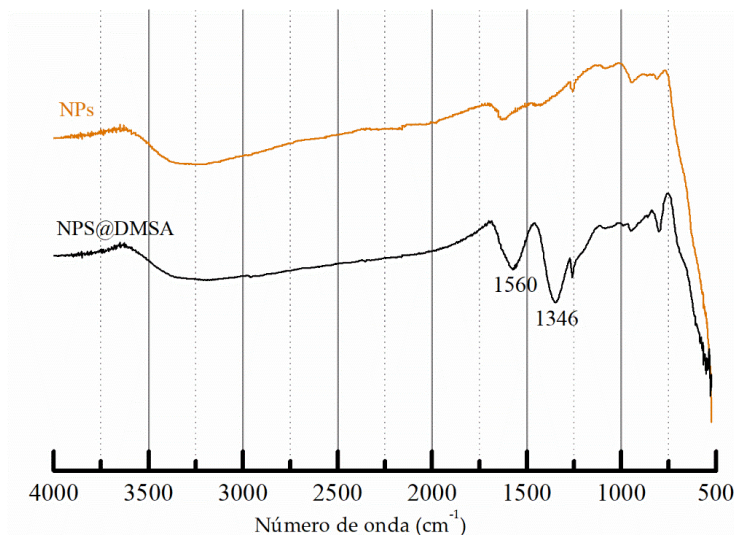


Figura 4.7 – Espectros de FTIR referentes a NPs sem revestimento de PQ4 (castanho) e de NPs revestidas com DMSA (RD2).

Quanto à identificação da ligação da lisina ao composto anterior, foi realizado um procedimento idêntico, sendo o espectro da lisina pura e de outros aminoácidos/proteínas já conjugados com as NPs@DMSA usados como referência. Neste caso a ligação ao DMSA, como ilustrada no esquema da figura 3.3, é realizada entre o grupo carbonilo presente no grupo carboxilato à superfície das NPs@DMSA e um dos $-\text{NH}_2$ presentes na lisina. É de referir que uma vez que o aminoácido apresenta dois grupos $-\text{NH}_2$ na sua composição, a ligação poderá ocorrer de duas formas distintas, como ilustrada na figura 4.8.

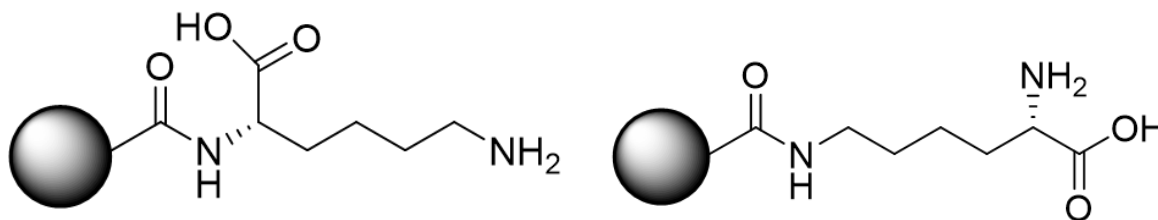


Figura 4.8 – Conjugações possíveis entre as NPs@DMSA e o aminoácido de lisina. A configuração da esquerda é mais provável de acontecer, uma vez que o pK_a do $-\text{NH}_3^+$ daquela posição, é mais reduzido. No entanto também existe a possibilidade de a conjugação da direita ocorrer.

A análise dos gráficos da figura 4.9, juntamente com alguns resultados presentes na literatura, permitiu identificar as bandas referentes as seguintes ligações. Nas partículas revestidas com

aminoácidos as vibrações de alongamento C=O e C-O podem ser identificadas para valores próximos de 1640 e 1460 cm^{-1} , respetivamente. A 2919 cm^{-1} temos a vibração de estiramento da ligação C-H e a cerca de 3300 cm^{-1} uma banda ligeiramente mais larga referente ao modo de vibração de alongamento de N-H [79]) [35], visto que o aminoácido escolhido apresenta os dois grupos NH_2 , como já foi referido. Foi ainda possível identificar bandas em torno de 1050 e 960 devidas à vibração de alongamento C-O e de flexão de $-\text{NH}_2$, respetivamente [80] [73].

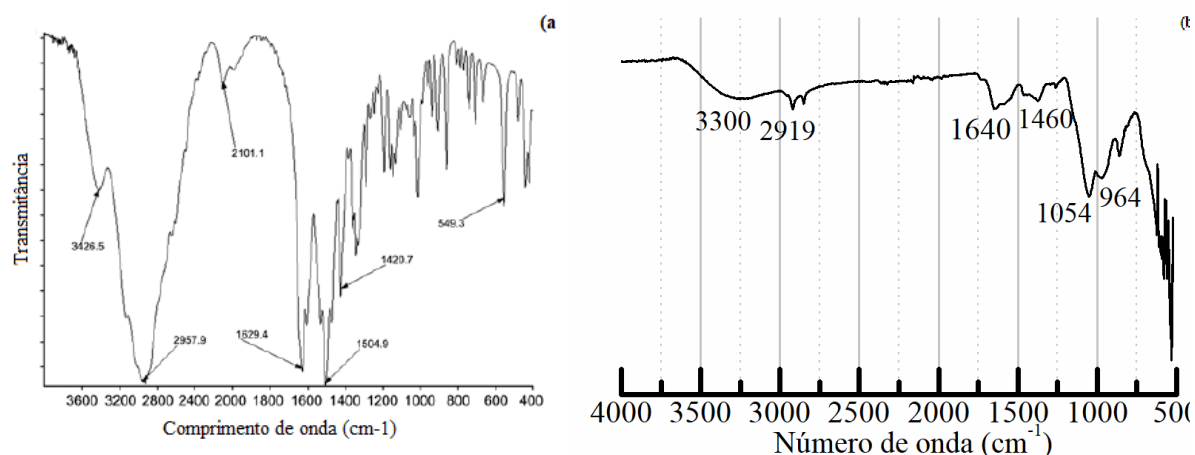


Figura 4.9 – Espectro de FTIR da Lisina pura (a) [35] e da amostra de NPs@DMSA@Lys obtida (b).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE TRANSMISSÃO

De forma a obter uma distribuição mais significativa dos diâmetros das NPs revestidas com DMSA, bem como inferir sobre o seu estado de agregação em solução, foi realizada uma análise por TEM. Para tal foram adquiridas imagens de NPs@DMSA sintetizadas todas nas mesmas condições, variando apenas o tempo de permanência no banho de ultrassons – 1 h, 3 h e 5 h. As imagens adquiridas foram analisadas recorrendo ao programa ImageJ, que permitiu obter a distribuição de tamanhos para cada amostra. Nas figura 4.10, 11 e 12 encontram-se apresentados estes resultados e respetiva análise.

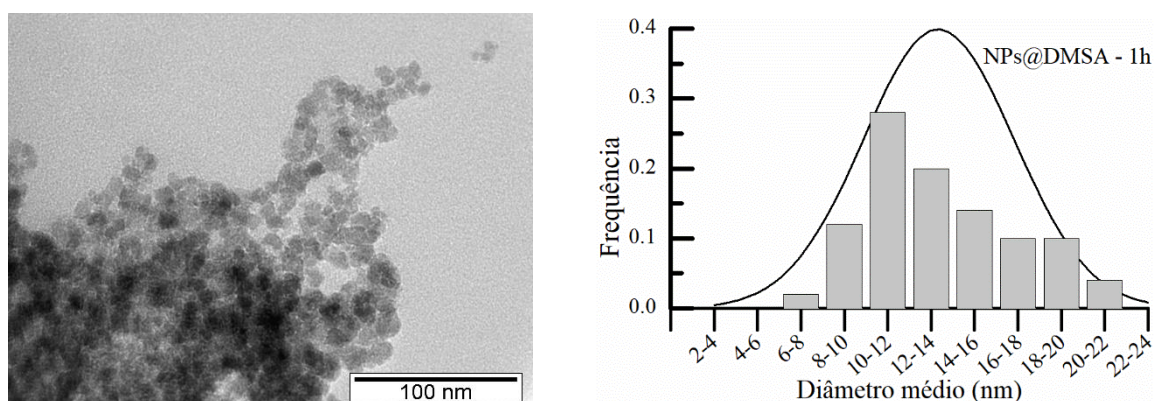


Figura 4.10 – Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 1 h.

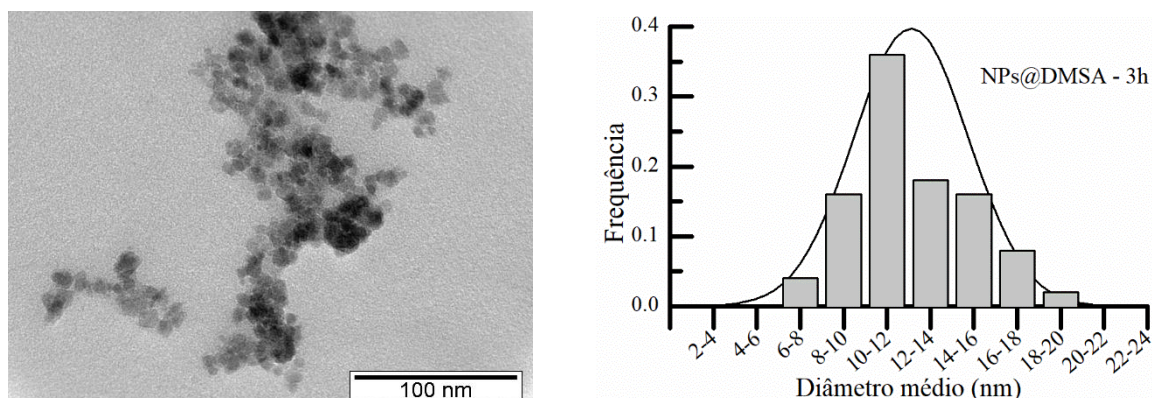


Figura 4.11 - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 3 h.

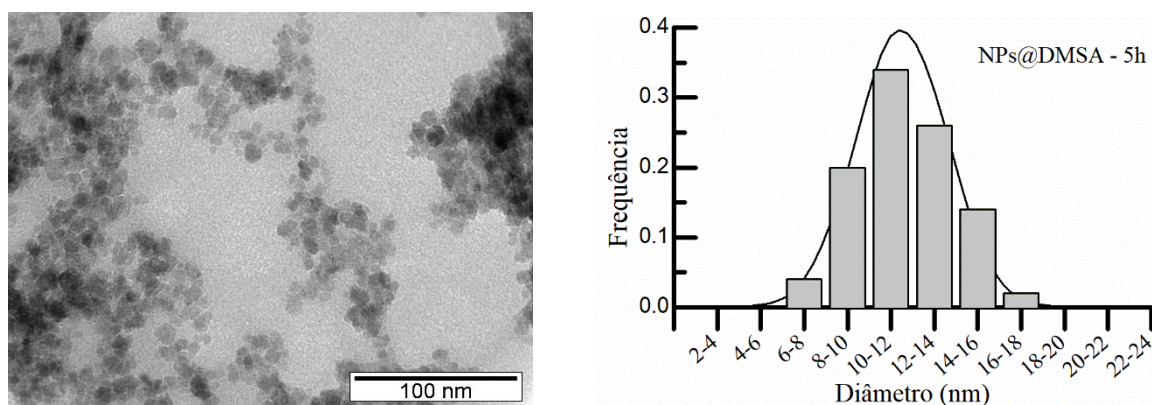


Figura 4.12 - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanhos para NPs@DMSA – 5 h.

Como é possível evidenciar pelos gráficos obtidos, em todos eles a maior incidência de tamanhos corresponde a diâmetros médios compreendidos entre 10 e 12 nm. Com o aumento do tempo de permanência em banho de ultrassons, é possível verificar um ligeiro estreitamento da curva de *gauss*, devido à diminuição da população para gamas de diâmetros mais afastados do valor médio. Este facto leva a crer que quanto mais tempo a amostra permanecer em banho de ultrassons, mais homogênea e com menos agregados esta ficará.

À primeira vista estes resultados não parecem coerentes com as dimensões obtidas por DLS para os diâmetros hidrodinâmicos, que se encontram na ordem das centenas de nanómetros. Este acontecimento pode ser explicado, pelo facto da técnica de TEM não ser sensível ao revestimento, o que torna o DMSA invisível. Deste modo, as dimensões registadas neste subcapítulo são referentes apenas aos núcleos de magnetite. Por outro lado, quando comparados com os tamanhos médios dos cristalites calculados no subcapítulo Difração de Raio-X (DRX), é possível evidenciar que são praticamente iguais. Na literatura foi também possível encontrar resultados idênticos no caso de NPs revestidas com DMSA [78][33]

4.5 MAGNETIZAÇÃO

De forma a avaliar a influência do revestimento (DMSA), nas propriedades magnéticas do composto sintetizado, foram realizados ensaios de magnetização em amostras de NPs@DMSA. A figura 4.13 representa a curva de magnetização para duas temperaturas distintas, em função do campo magnética aplicado. O valor da magnetização de saturação (M_s) é cerca de 50 emu/g, que comparado com o valor de referência para as NPs de magnetite (90-100 emu/g) [12], sofreu uma ligeira descida. Este valor é coerente com os encontrados na literatura para NPs revestidas com DMSA [80].

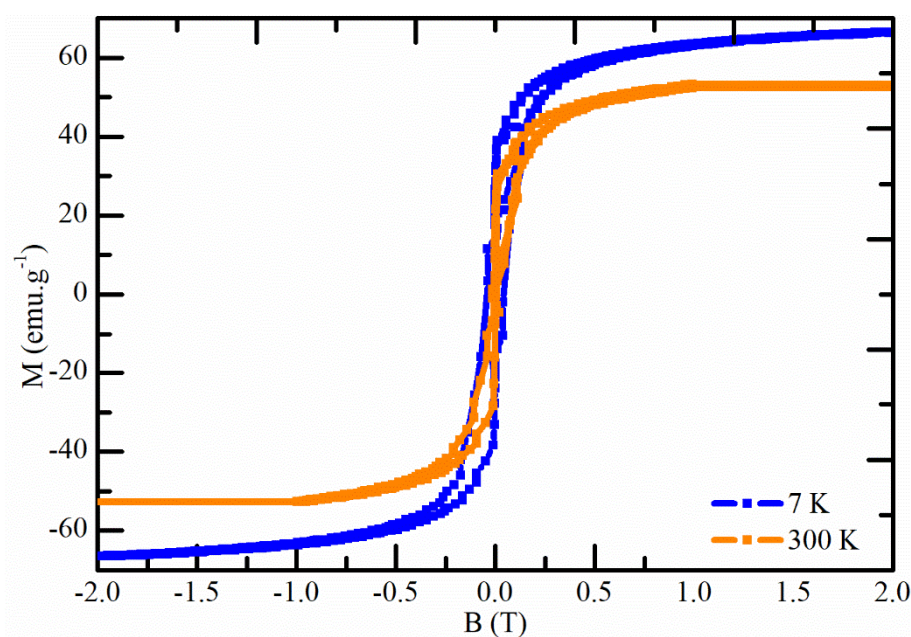


Figura 4.13 – Magnetização em função do campo magnético aplicado a 300 K (laranja) e a 7 K (azul) para NPs@DMSA.

Embora seja perceptível uma ligeira histerese nas curvas do gráfico da figura 4.13, este é residual, pelo que é correto afirmar que o comportamento magnético destas amostras assemelha-se ao de IONPs superparamagnéticas. Uma vez que esta condição é verificada para as duas curvas, e sendo que as mesmas foram realizadas num intervalo de temperaturas que contém a temperatura ambiente (aproximadamente 293 K), podemos considerar que a esta mesma temperatura as NPs@DMSA são superparamagnéticas.

4.6 RELAXOMETRIA POR RMN

A utilização das NPs como agentes de contraste (AC), implica o conhecimento do seu comportamento ao nível do efeito na relaxação da água. Através de relaxometria por RMN, foi realizada a medição dos tempos de relaxação longitudinal e transversal, das moléculas de água quando em

contacto com as amostras de nanopartículas sintetizadas. Para tal foram avaliadas suspensões de NPs@DMSA e de NPs@DMSA@Lys, previamente preparadas nas seguintes concentrações - 0,5 mM; 1,5 mM e 3 mM -, bem como uma amostra contendo apenas água ultrapura utilizada para preparar as soluções, de forma a ter uma amostra como referência de meio. Em cada aquisição foram realizadas 3 medições por amostra, o que resulta num total de nove medições por aquisição. Assim sendo, todos os valores de T_1 , T_2 , ou seus inversos, representam a média de três valores, e como tal estão associados a um desvio-padrão.

Relativamente à amostra de referência obteve-se os seguintes tempos de relaxação:

$$\checkmark \quad T_{1ref} = 4,21 \text{ s}$$

$$\checkmark \quad T_{2ref} = 2,91 \text{ s}$$

Comparando estes valores com os obtidos para amostras contendo diferentes concentrações de nanopartículas foi possível calcular a atenuação relativa associada a cada uma das amostras, através da equação 4.3

$$T_{atenuação}(\%) = \frac{(T_{iref} - T_i)}{T_{iref}} \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

onde T_{iref} representa a relaxação longitudinal ($i = 1$) ou transversal ($i = 2$) de referência, T_i a relaxação longitudinal ($i = 1$) ou transversal ($i = 2$) para as amostras contendo nanopartículas.

Nas tabelas 4.6 estão organizados todos estes valores com os respetivos desvios de padrão, em função da concentração e do tipo de nanopartículas em solução.

Tabela 4.6 – Tempos de relaxação transversais e longitudinais de NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys, para concentrações compreendidas entre 0,5 mM e 3,0 mM. Nas colunas ao lado de T1 e T2 estão as atenuações em percentagem.

| Amostra | | T1 (ms) | $T_{atenuação} (\%)$ | T2 (ms) | $T_{atenuação} (\%)$ |
|--------------|--------|-----------|----------------------|-------------|----------------------|
| NPs@DMSA | 0,5 mM | 1421 ± 7 | 66,2 | 7,94 ± 0,04 | 99,7 |
| | 1,5 mM | 443 ± 9 | 89,5 | 2,79 ± 0,03 | 99,9 |
| | 3,0 mM | 387 ± 2 | 90,8 | 1,86 ± 0,01 | 99,9 |
| NPs@DMSA@Lys | 0,5 mM | 2018 ± 14 | 52,1 | 281 ± 3,00 | 90,3 |
| | 1,5 mM | 399 ± 4 | 90,5 | 2,6 ± 0,10 | 99,9 |
| | 3,0 mM | 220 ± 2 | 94,8 | 1,32 ± 0,01 | 99,9 |

Como é possível evidenciar pelos resultados obtidos, tanto T_1 como T_2 diminuíram em relação aos valores de referência dos tempos de relaxação da água na ausência das partículas sintetizadas. Comparando os declínios provocados em cada um dos tempos de relaxação, é perceptível que este é mais acentuado em T_2 do que em T_1 , tanto com o aumento de concentração de NPs@DMSA como de NPs@DMSA@Lys. Deste modo, é expectável que ambos os grupos de partículas se comportem como agentes de contraste negativo.

Quando comparadas amostras contendo diferentes tipos de NPs, é possível evidenciar 3 situações distintas quanto ao comportamento destas duas entidades:

1. Para concentrações mais baixas - 0,5 mM - as NPs@DMSA@Lys apresentam menor capacidade de reduzir os dois tempos de relaxação quando comparadas às NPs@DMSA. Esta diferença é mais acentuada em T_1 (cerca de 15%) do que em T_2 (cerca de 9%);
2. Para concentrações intermédias - 1,5 mM - as reduções dos dois grupos de partículas são praticamente idênticas, sendo cerca 90% para T_1 e 99,90% para T_2 . Nestas condições é expectável que o comportamento como agente de contraste seja semelhante;
3. Para as concentrações mais elevadas - 3,0 mM - as NPs@DMSA@Lys provocam uma redução mais acentuada em T_1 do que as NPs@DMSA (uma diferença de cerca de 4%), sendo que em T_2 já não ocorrem grandes diferenças, uma vez que já foi reduzido praticamente 100%.

Estas três situações ficam bastante evidentes nos gráficos da figura 4.14, uma vez que é possível visualizar que as retas dos ajustes lineares das taxas de relaxação de T_1 e T_2 de grupos de partículas distintas se cruzam. A amostra de NPs@DMSA a 1,5 mM apresenta um desvio da linearidade no gráfico da taxa longitudinal. Pela análise dos ajustes, seria expectável que as taxas de relaxação longitudinais das duas amostras fossem iguais para valores entre 0,5 e 1,0 mM. Esta incoerência pode estar relacionada com um erro de pipetagem durante a preparação das amostras.

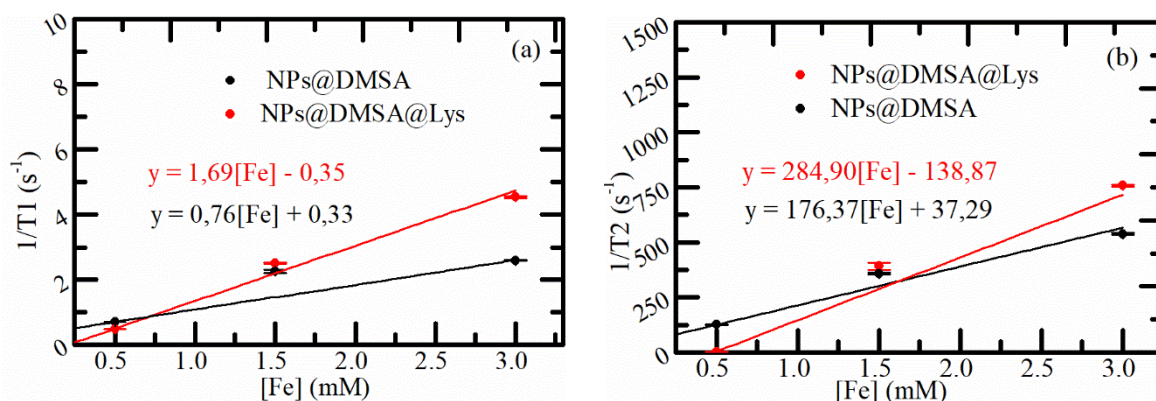


Figura 4.14 – Taxa de relaxação longitudinal (a) e transversal (b) de NPs@DMSA (a vermelho) e NPs@DMSA@Lys (a preto). As retas representam os ajustes lineares efetuados, cujo declive representa o valor da relaxividade longitudinal (no gráfico (a)) e transversal (no gráfico (b)).

Deste modo fica perceptível que tratando-se de imagens ponderadas em T_2 , as NPs@DMSA@Lys apenas apresentam uma maior capacidade de contraste para concentrações superiores a sensivelmente 1,5 mM, enquanto que quando ponderadas em T_1 , valores ligeiramente mais baixos já são suficientes. Assim sendo estima-se que em ensaios de imagem, para concentrações mais elevadas, o contraste exibido pelas NPs@DMSA@Lys seja superior ao das NPs@DMSA (para qualquer uma das ponderações). Estes gráficos permitiram ainda retirar os valores das relaxividades longitudinal (r_1) e transversal (r_2), que correspondem aos declives dos ajustes lineares dos gráficos. Estes valores foram registados na

| Amostra | r_1 ($s^{-1}mM^{-1}$) | R^2 | r_2 ($s^{-1}mM^{-1}$) | R^2 | r_2/r_1 |
|----------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|-----------|
| NPs@DMSA@Lysys | 1,69 | 0,99 | 284,90 | 0,91 | 171 |
| NPs@DMSA | 0,76 | 0,99 | 176,37 | 0,97 | 232 |

tabela 4.7, juntamente com os respetivos fatores de correlação (R^2).

Tabela 4.7 – Relaxividade longitudinal e transversal das NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys e respetivos fatores de correlação (R^2).

| Amostra | r_1 ($s^{-1}mM^{-1}$) | R^2 | r_2 ($s^{-1}mM^{-1}$) | R^2 | r_2/r_1 |
|----------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|-----------|
| NPs@DMSA@Lysys | 1,69 | 0,99 | 284,90 | 0,91 | 171 |
| NPs@DMSA | 0,76 | 0,99 | 176,37 | 0,97 | 232 |

Quanto maior o valor das relaxividades, menor a quantidade de agente de contraste necessário para efetuar o exame médico. No presente estudo, quando comparados estes valores no caso das NPs@DMSA, com os de estudos já realizados com o mesmo composto (mas com um D_h inferior) – r_1 igual a 2,6 ms e r_2 igual a $110 s^{-1}mM^{-1}$ [81]-, temos que a relaxação transversal se mostrou ligeiramente superior, ao passo que a longitudinal um pouco inferior, traduzindo-se numa razão r_2/r_1 superior. Este acontecimento pode advir da formação de agregados, uma vez que estes provocam efeitos distintos nas relaxividades. Por um lado, temos a formação de agregados internos dos núcleos de magnetite, que contribuem para o aumento de r_2 , devido ao aumento do momento magnético total que consequentemente fazem com que os prótons relaxem mais rápido. Por outro lado, temos os agregados devidos à contribuição da estrutura global das partículas, que juntamente com a distribuição de campo magnético à superfície, fazem com que as moléculas de água permaneçam mais tempo no seu interior e consequentemente relaxem de forma mais lenta, diminuindo r_1 [82][83].

Comparando agora os diferentes grupos de partículas sintetizados, estes dados evidenciam um aumento das relaxividades transversal e longitudinal com a adição do aminoácido de lisina às NPs@DMSA. Em ambos os casos a razão r_2/r_1 é elevada, o que indica que serão adequados à utilização

como agentes de contraste negativo, em particular o elevado r_2 significa que poderão ser utilizados para adquirir imagens ponderadas em T_2 , como aliás, é característico das IONPs.

Nas NPs@DMSA@Lys, a funcionalização com lisina resultou numa diminuição desta razão pois apesar de r_2 ter incrementado, houve uma variação relativa superior em r_1 . As alterações na relaxividade são ditadas não só pelas propriedades magnéticas intrínsecas das NPs, mas também pelo modo como as moléculas de água difundem no gradiente de campo magnético que se faz sentir em redor das NPs. Recordando os resultados de DLS, as amostras de NPs@DMSA@Lys apresentavam raios hidrodinâmicos superiores e menores índices de polidispersão quando comparadas às NPs@DMSA. O aumento da dimensão das NPs pode causar o aumento da r_2 , no entanto causa também a diminuição de r_1 [33]. No presente estudo observou-se um aumento tanto em r_1 como em r_2 , como tal, estas variações das relaxividades poderão estar associadas às alterações no revestimento das NPs. Com a ligação da lisina, deu-se a introdução de grupos NH/NH₂ e CONH no revestimento das NPs@DMSA, que poderão ser aceitadores/doadores de pontes de hidrogénio. Estes grupos poderão assim contribuir para que as moléculas de água relaxem mais rapidamente, refletindo-se num aumento de r_1 .

Noutros estudos realizados com NPs@DMSA, foi identificada a capacidade de estas se comportarem como AC negativo e positivo em simultâneo, dependendo dos parâmetros experimentais e sequência de pulso utilizado. De facto, os seus valores de r_2 e de r_1 , eram substancialmente superiores, respetivamente, aos de AC negativos e positivos comerciais [84]. Da mesma forma, as NPs@DMSA@Lys sintetizadas, apresentam valores superiores, comparativamente às NPs@DMSA, das duas relaxividades. Assim sendo, fica evidenciada não só a sua capacidade de AC em imagens ponderadas em T_2 , como a potencialidade de também serem utilizadas em ponderações em T_1 , demonstrando uma elevada versatilidade das NPs@DMSA@Lys.

4.7 IMAGEM POR RMN

Nestes ensaios foi testado o contraste exibido por amostras contendo diferentes tipos de nanopartículas em função da sua concentração. Para este efeito, foram previamente preparadas, amostras de NPs@DMSA e de NPs@DMSA@Lys para as seguintes concentrações - 0 mM; 0,5 mM; 1,5 mM; 2 mM e 3 mM -, que correspondem a concentrações de Fe de 0 mg/mL, 0,0279 mg/mL, 0,0838 mg/mL, 0,1117 mg/mL e 0,1675 mg/mL. Todos os ensaios adquiridos foram realizados a 36 °C, de forma a simular a temperatura corporal, sendo utilizado um protocolo de imagem FLASH, com um tempo de repetição (TR) de 1000 ms, tempo de eco (TE) de 2,3 ms e *flip angle* de 20°.

Inicialmente foram realizados alguns ajustes nos parâmetros de aquisição, de forma a obter imagens de boa qualidade, onde fosse possível evidenciar contraste. Nos ensaios ilustrados pelas figuras

4.15 e 4.16 apenas se fez variar o número de médias na aquisição das imagens, que consequentemente provocou uma melhoria na resolução, mas também um acréscimo do tempo de aquisição.

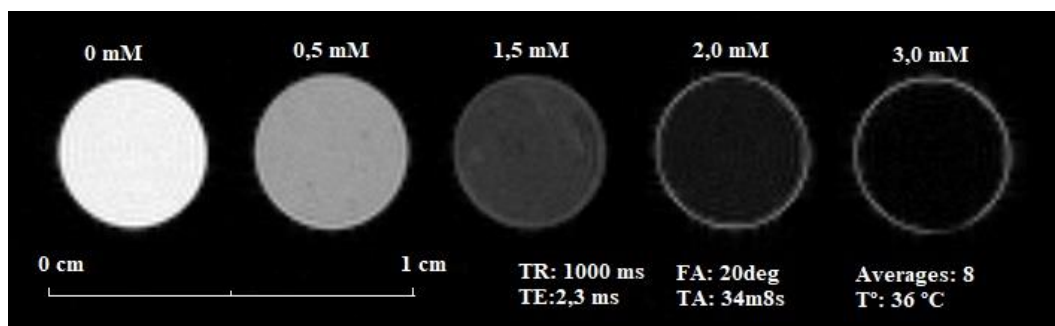


Figura 4.15 - Ensaios de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA. Número de médias igual a 8.

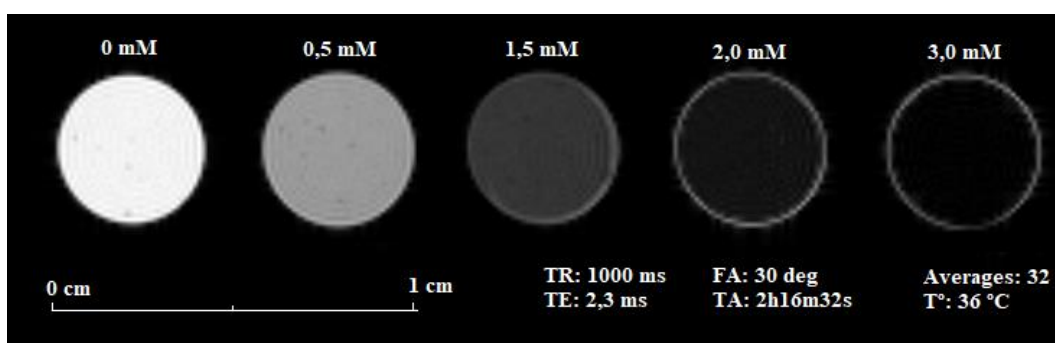


Figura 4.16 - Ensaios de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA. Número de médias igual a 32.

Para as experiências subsequentes optou-se por aquisições com maior resolução para melhor caracterizar o efeito das NPs sintetizadas. Fica, no entanto, demonstrada a capacidade de detetar contraste em experiências 4 vezes mais rápidas, e como mais adequadas a técnicas de teragnóstico. O estudo prosseguiu com a análise das NPs@DMSA@Lys, tendo sido a aquisição das imagens realizada nas mesmas condições da segunda análise das NPs@DMSA. A figura 4.17 representa os resultados obtidos desta aquisição.

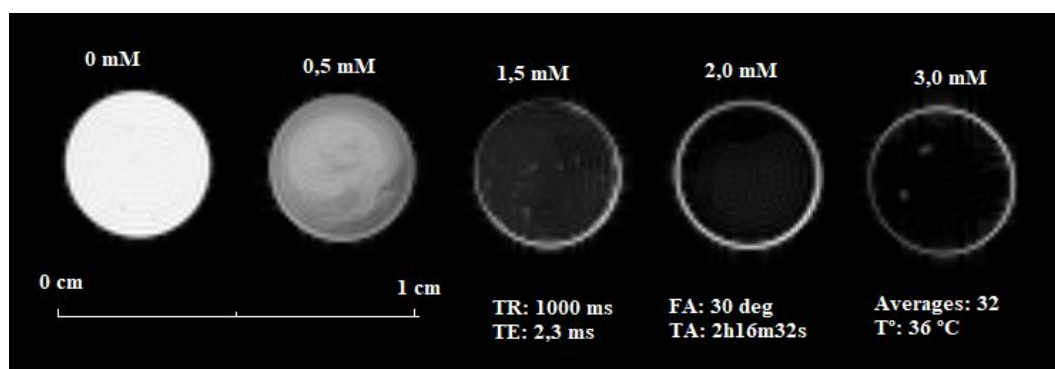


Figura 4.17 - Ensaios de imagem por ressonância magnética nuclear para diferentes concentrações de NPs@DMSA@Lys. Número de médias igual a 32.

É possível evidenciar, para ambas as amostras de NPs, que as imagens ficam mais escuras com o aumento da concentração. Recordando os dados de relaxometria, facilmente é relacionado que maiores atenuações nos tempos de relaxação traduzem-se numa maior diminuição do sinal medido (mais escuro). Deste modo, é confirmado que o comportamento das NPs é idêntico ao de um agente de contraste negativo. Esta redução do tom de cinzento é mais perceptível para concentrações mais baixas, visto que para valores superiores se atinge rapidamente a saturação de sinal. De facto, nos ensaios de relaxometria, foi evidente que para valores superiores a 1,5 mM o valor de T_1 já foi atenuado mais de 90% para ambas as amostras. Deste modo, um aumento da concentração para valores superiores não irá provocar uma grande atenuação destes tempos e consequentemente do tom de cinzento.

Comparando agora os dois grupos de nanopartículas, numa primeira análise foi possível registar que apenas para concentrações iguais a 1,5 mM é que é possível identificar oscilações nos tons de cinzento, que se traduzem em contrastes mais acentuados para as NPs@DMSA@Lys. Deste modo, esta evidência, comprova que os dois compostos apresentam ligeiras diferenças no comportamento quando se trata de gerar contraste em imagem ponderada em T_1 , especificamente para esta concentração, pelo que a hipótese sugerida no subcapítulo anterior sobre um possível erro de pipetagem ganha alguma credibilidade. Nas restantes concentrações não foi possível verificar grandes oscilações no tom de cinzento. É de referir ainda, que no caso das amostras de NPs@DMSA@Lys é possível encontrar alguma heterogeneidade, devido à presença de alguns pontos mais claros para concentrações mais elevadas.

Para uma análise mais precisa relativamente a este ponto, foi utilizado o programa ImageJ para quantificar o grau de cinzento das amostras. Através da função “*histogram*”, foi possível obter uma distribuição com as contagens relativas (%) em função do grau de cinzento para cada uma das concentrações. Nesta etapa procurou-se evitar zonas que contivessem grande heterogeneidade, de forma

a não influenciar os resultados obtidos. Nos gráficos da figura 4.18 podemos ver estas distribuições referentes às amostras de (a) NPs@DMSA e de (b) NPs@DMSA@Lys.

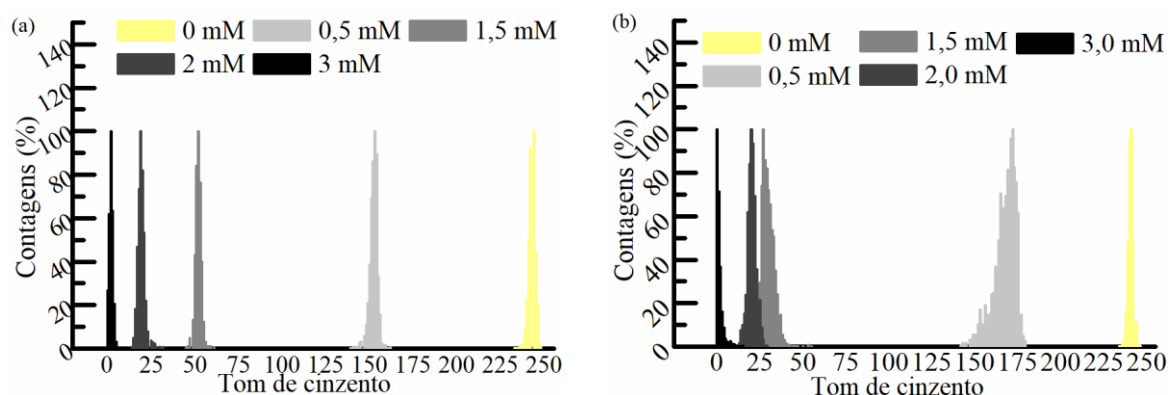


Figura 4.18 – gráficos com o número de pixéis encontrados em função do tom de cinzento, para cada uma das concentrações. O gráfico da esquerda é referente a amostras de NPs@DMSA e o gráfico da direita a NPs@DMSA@Lys.

Foi possível verificar que há um ligeiro deslocamento dos picos do gráfico (a) para o (b), nomeadamente para a concentração 1,5 mM. Para as concentrações extremas superiores, não se evidencia grandes diferenças, uma vez que, como já foi referido, a atenuação de T_I para estas concentrações já ultrapassou os 90%, estando praticamente saturado o sinal. Para 0,5 mM, ocorreu um alargamento dos picos para valores próximos do valor médio no caso das amostras de NPs@DMSA@Lys. Este último acontecimento, como já referido, é devido ao facto de as amostras não serem muito homogêneas, acabando por criar tons próximos do valor médio. Esta informação é coerente com a hipótese supracitada, de que os dois compostos apresentam ligeiras diferenças no que toca à capacidade de gerar contraste. Destes gráficos foram extraídos, e organizadas na tabela 4.8, os valores médios referentes ao tom de cinzento para cada uma das amostras, que confirmam as observações feitas anteriormente de que para 1,5 mM foi a concentração onde se evidenciou maior diferença no tom de cinzento, bem como que a 0,5 mM as NPs@DMSA, ainda apresentam maior capacidade de gerar contraste.

Tabela 4.8 – Valores médios do tom de cinzento, numa escala de 0 a 255, em função da concentração (mM) de NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys.

| AMOSTRA | 0 mM | 0,5 mM | 1,5 mM | 2,0 mM | 3,0 mM |
|--------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------|
| NPs@DMSA | 240 ± 2 | 152 ± 3 | 52 ± 2 | 19 ± 3 | 2 ± 2 |
| NPs@DMSA@Lys | 240 ± 2 | 167 ± 7 | 29 ± 4 | 20 ± 3 | 2 ± 2 |

Nas figuras 4.19 e 4.20 estão representados cortes em perfil das diferentes amostras na mesma escala de 255 cores (em que 0 e 255 representam, respetivamente, preto e branco), em função da

concentração das amostras. Esta funcionalidade permite visualizar de forma mais realista aquilo que foi medido. O comando recorrido foi o “plot profile”. Cada um dos gráficos ilustra um corte realizado verticalmente ao longo dos tubos de RMN contendo as amostras de NPs para diferentes concentrações – da esquerda para a direita, de 0 mM até 3,0 mM. Nestas figuras é possível evidenciar alguns uns picos mais intensos, que parecem estar desenquadrados. Estes são referentes quer às paredes do tubo de RMN, quer a heterogeneidade das amostras.

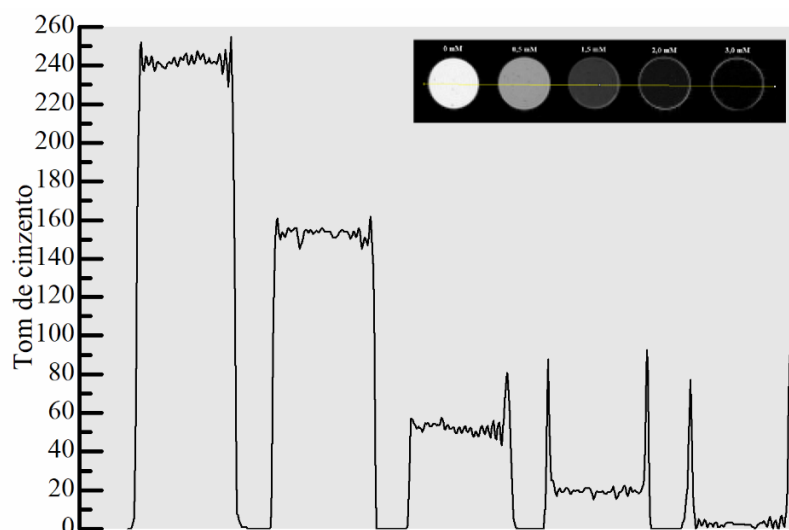


Figura 4.19 – Corte de perfil das amostras de NPs@DMSA com os respetivos tons de cinzento.

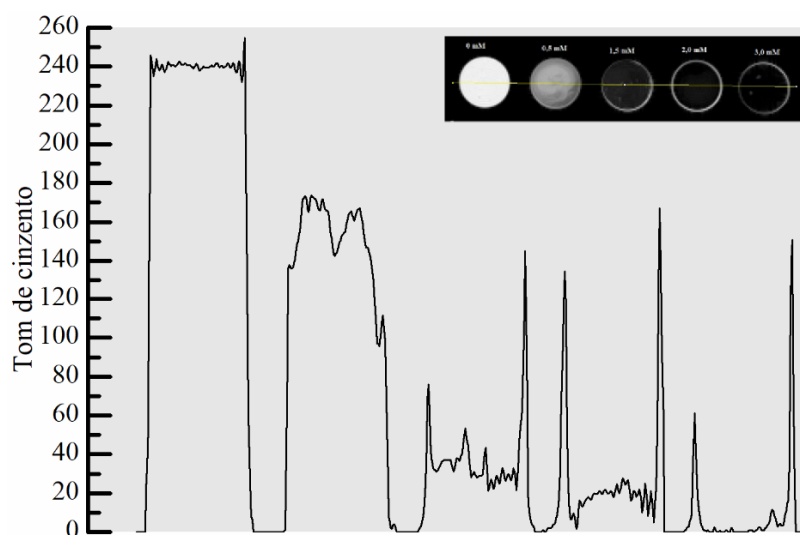


Figura 4.20 – Corte de perfil das amostras de NPs@DMSA@Lys com os respetivos tons de cinzento.

Em suma, os resultados desta secção, juntamente com as observações efetuadas anteriormente, vieram reforçar as hipóteses seguintes:

1. O contraste exibido pelas amostras, independentemente do tipo de partículas, aumenta com a concentração das mesmas, exibindo em ambos os casos, um comportamento semelhante a um contraste negativo;
2. Tanto as amostras de NPs@DMSA como as de NPs@DMSA@Lys, demonstram valores de r_2 , bem como de r_2/r_1 elevados;
3. As NPs@DMSA@Lys apresentam r_2 e r_1 superiores às NPs@DMSA, pelo que são mais capazes de gerar contraste do que estas em imagens ponderadas em T_1 ou em T_2 ;
4. A concentração crítica onde os dois grupos de partículas trocam de liderança relativamente à capacidade de gerar contraste em imagens ponderadas em T_1 , está compreendida entre 0,5 mM e 1,5 mM.

4.8 HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Foi testada a capacidade de aquecimento das nanopartículas revestidas com DMSA e funcionalizadas com lisina, em função da concentração de ferro em solução. Cada um destes dois tipos de partículas, foi ainda subdividido em dois grupos – dissolvidos em água ultrapura e em ágar 0,5%. Esta última divisão permitiu inferir sobre o efeito que cada um dos mecanismos de relaxação no processo de libertação de calor, importante para estimar o aquecimento produzido quando as NPs apresentam maior/menor liberdade de movimento. Todas as aquisições efetuadas tiveram a duração de 10 minutos, com a aplicação de um campo magnético alternado com intensidade de 24 kA.m^{-1} e frequência de 418,5 kHz.

Inicialmente foi testada a capacidade de aquecimento em função da concentração de NPs presente em amostra. Para tal foram registadas as temperaturas finais e iniciais em cada aquisição, e realizado um ajuste linear das curvas de aquecimento. Na figura 4.21 estão as representações gráficas do aquecimento provocado por cada uma das nanopartículas, em função da concentração e do meio.

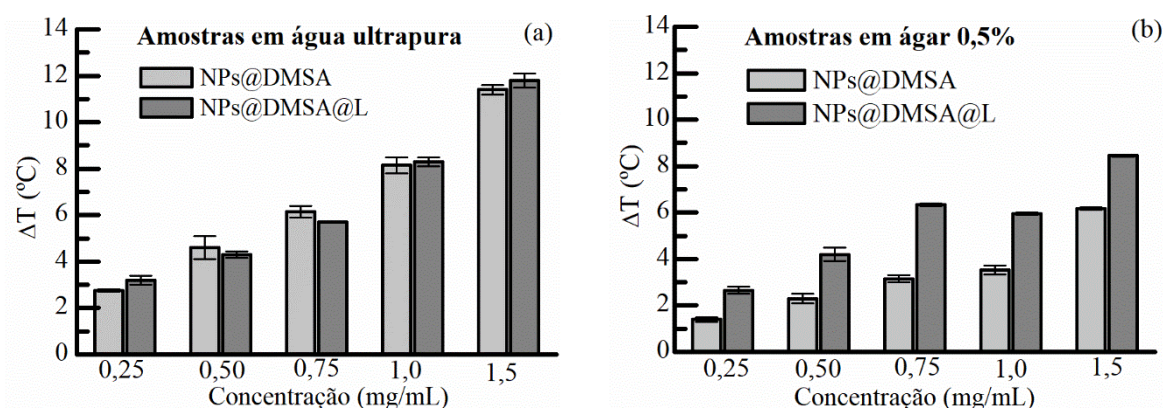


Figura 4.21 - Variações de temperatura (ΔT em $^{\circ}\text{C}$) em função da concentração de ferro para amostras de NPs@DMSA (cinzento claro) e NPs@DMSA@Lys (cinzento escuro) em água ultrapura (a) e ágar 0,5% (b).

Dentro do mesmo tipo de nanopartículas, foi possível evidenciar em todas as amostras, um aumento da variação de temperatura com o aumento da concentração de Fe/NPs. De facto, quanto maior a concentração em solução, maior será o número de partículas que irão contribuir para o aumento da temperatura. Uma vez fixa a concentração de ferro e o tipo de nanopartículas, foi ainda possível relacionar o meio solvente com o poder de aquecimento, demonstrando que as amostras em água ultrapura exibem uma maior capacidade de aquecimento do que as em ágar 0,5%. Tal resultado seria de esperar, uma vez que apenas as amostras dissolvidas em água exibem os dois tipos de relaxação (Néel e de Brown) responsáveis pela libertação de calor no processo de hipertermia magnética. No caso das amostras em ágar 0,5%, procurou-se simular a situação em que as NPs são absorvidas por células tumorais e permanecem fixas. Nesta situação apenas a relaxação de Néel contribui para a libertação de calor.

De forma a analisar de forma mais detalhada o comportamento de cada um destes dois tipos de partículas consoante o meio inserido, foi representado na figura 4.22 gráficos de pontos com a variação da temperatura em função da concentração de ferro, com o respetivo ajuste linear e fator de correlação (R^2).

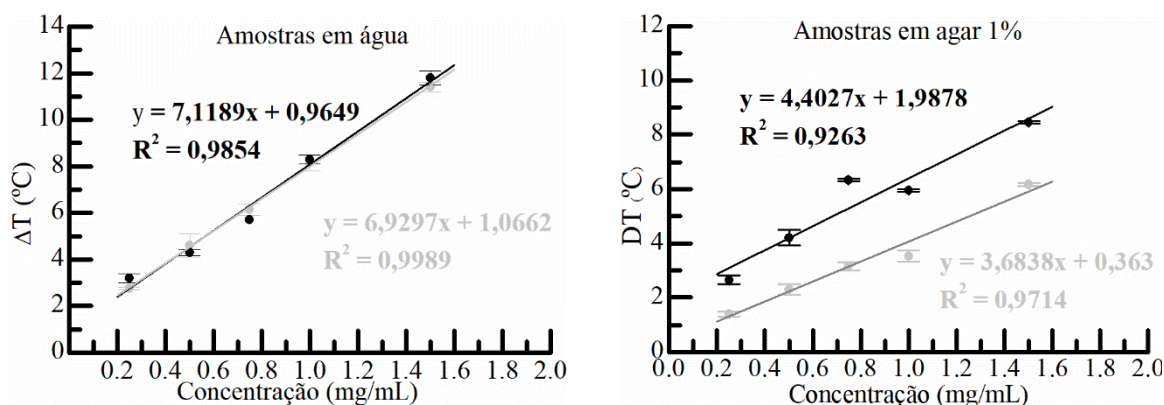


Figura 4.22 – Variação da temperatura, ΔT , em função da concentração de ferro em solução. O gráfico da esquerda é referente às amostras em água ultrapura e o da direita em ágar 0,5%. As retas a preto são referentes às amostras de NPs@DMSA@Lys e as a cinzento às de NPs@DMSA.

Para ambos os meios, as NPs@DMSA@Lys foram as que demonstraram uma maior capacidade de aquecimento com o aumento da concentração de ferro em solução, evidenciado pela superioridade dos seus declives. Esta superioridade é mais significativa nas amostras em ágar 0,5%, sendo que em água não foram encontradas grandes diferenças. Outra grande diferença que apenas é possível identificar nas amostras em ágar 0,5%, é o facto de os aquecimentos (fixando uma concentração) serem ligeiramente superiores no caso das NPs@DMSA@Lys, quando comparadas às amostras sem o aminoácido. Estas diferenças são bastante perceptíveis pelo afastamento das retas com a alteração de meio.

A variação do valor da taxa de absorção específica (SAR) em função da concentração de ferro e do meio solvente, estão ilustradas nos gráficos da figura 4.23.

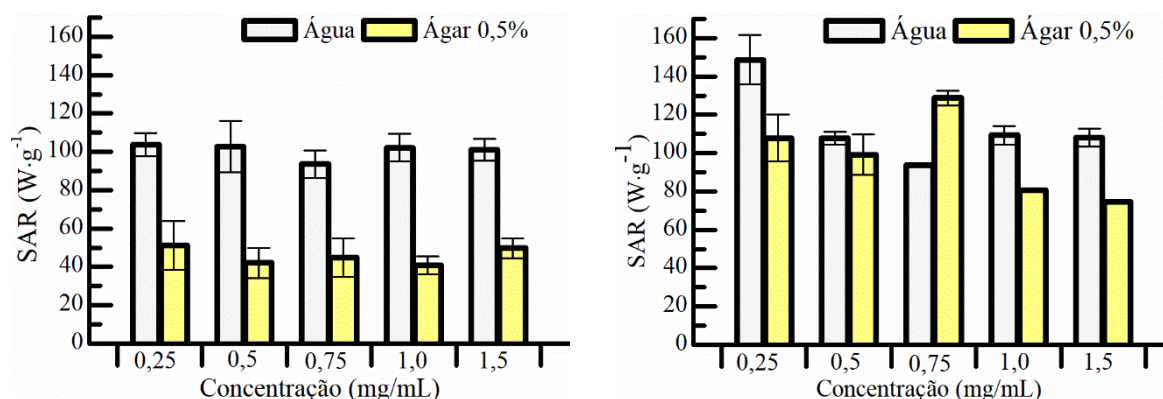


Figura 4.23 – Valores médios da taxa de absorção específica em função da concentração de Fe e do meio. O gráfico da esquerda é referente às amostras de NPs@DMSA e o da esquerda de NPs@DMSA@Lys.

Relativamente a estes, foi possível evidenciar que praticamente na totalidade dos ensaios (à exceção das NPs@DMSA@Lys a 0,75 mg/mL), quanto maior a liberdade de movimento das partículas, maior será a taxa de absorção específica. No caso das amostras de NPs@DMSA, constatou-se que estes valores praticamente não oscilaram com a concentração, sendo aproximadamente 100 W/g quando dissolvidas em água e 45 W/g em ágar 0,5%. Com a adição da lisina constatou-se que quando em meio aquoso, os valores de SAR também não variam muito para concentrações compreendidas entre 0,5 e 1,5 mg/mL, diferenciando-se substancialmente para a concentração mais baixa (onde apresenta o valor mais elevado). Quando em ágar 0,5%, os valores parecem sofrer um ligeiro decréscimo com a concentração, à exceção da amostra já referida a 0,75 mg/mL. Algo que também é possível verificar pela análise gráfica, é que a diferença entre SARs dos diferentes meios, fixando determinada concentração, é sempre superior para as NPs@DMSA. Recorrendo a valores de referência da literatura, foi possível verificar que amostras aquosas de NPs sem revestimento, apresentam valores de SAR idênticos (97 W.g⁻¹), pelo que é possível que os revestimentos utilizados não tenham afetado significativamente a capacidade de aquecimento nestas condições [33].

Analisando detalhadamente estes resultados, e tendo em conta que no caso das amostras em ágar 0,5%, apenas temos a contribuição da relaxação de Néel para o aquecimento, podemos sugerir que o aquecimento libertado pelas NPs@DMSA@Lys é maioritariamente devido a este tipo de relaxamento. Por outro lado, as NPs@DMSA dependem numa proporção superior da relaxação de Brown, evidenciado pela descida do SAR quando em ágar 0,5%. Assim sendo, e porque para esta aplicação em específico, se pretende minimizar a quantidade de NPs a introduzir no organismo, seria mais apropriado recorrer as NPs@DMSA@Lys, para aplicar em tratamento por hipertermia magnética.

4.9 CITOTOXICIDADE

Com o objetivo de inferir sobre o caráter tóxico das NPs@DMSA, foram realizados ensaios citotóxicos em células Vero. Para tal foi utilizado o método direto, que basicamente consiste em colocar as nanopartículas em contacto direto com as células. Este procedimento, decorrido ao longo de 4 dias, iniciou-se com a sementeira onde foram cultivadas as células numa placa de 96 poços, com uma densidade celular de aproximadamente $19,6 \times 10^4$ células/mL. Após incubação durante a noite, foram colocadas 5 réplicas de NPs@DMSA com concentrações de - 500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ - em contacto com as células. Passadas 48h de incubação, foi realizado o teste da resazurina de forma a medir as absorvâncias em cada um dos poços a 570 e a 600 nm. Na figura 4.24 está ilustrado a placa antes de se medir as absorvâncias.

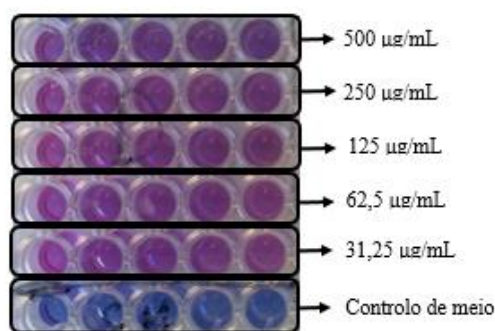


Figura 4.24 – Placa com NPs@DMSA em contacto com células Vero após a adição da resazurina e antes de serem medidas as absorvâncias

Neste teste, a resazurina funciona como indicador de viabilidade celular, uma vez que quando na presença de células metabolicamente ativas, este composto é reduzido a resorufina e adquire uma tonalidade rosa. Esta variação de cor é acompanhada por uma variação da absorvância, proporcional ao número de células viáveis presentes [85]. As absorvâncias medidas para os dois comprimentos de onda foram subtraídas juntamente com o controlo de meio, sendo que de cada quinteto resulta um valor que se relaciona com a viabilidade celular relativa.

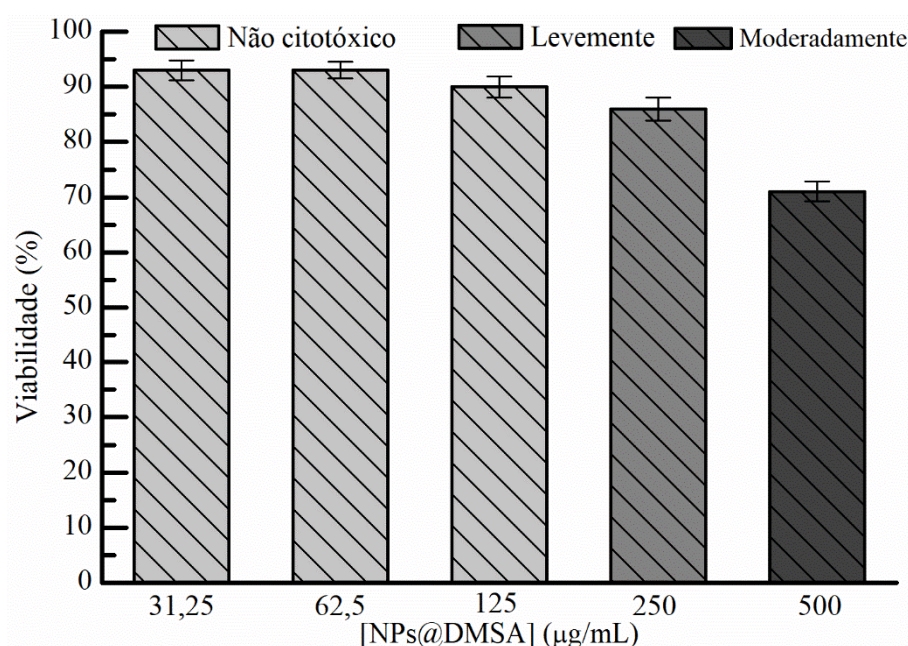


Figura 4.25 – Viabilidade celular de células Vero após 48 h em contacto direto com NPs@DMSA para concentrações compreendidas entre 31,25 µg/mL e 500 µg/mL.

Analisando a figura 4.25, é possível evidenciar que o aumento da concentração de NPs@DMSA provoca uma diminuição da viabilidade celular e, portanto, um aumento do caráter citotóxico. Para as três concentrações mais baixas – 31,25 µg/mL; 62,5 µg/mL e 125 µg/mL – não foram registadas grandes oscilações da viabilidade celular, tendo-se enquadrado todas estas amostras na categoria de não citotóxico (> 90 %). A partir destas concentrações passamos a entrar no domínio dos compostos citotóxicos, inicialmente levemente devido a uma ligeira redução de menos de 15% (para 250 µg/mL), e moderadamente para uma concentração de 500 µg/mL. Embora nenhuma das amostras testadas se inserisse no domínio dos compostos severamente citotóxicos, analisando a tendência gráfica, prevê-se que a utilização de concentrações superiores, pode ser incompatível com aplicações biomédicas.

É de referir que ainda foram realizados ensaios em células SaOs-2, com NPs@DMSA e NPs@DMSA@Lys, seguindo um procedimento idêntico ao descrito. No entanto devido à ocorrência de uma contaminação das amostras, não foi possível realizar o teste da resazurina na maioria dos poços, pelo que se abandonou o estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

Tal como apresentado no primeiro capítulo, o objetivo principal deste projeto foi sintetizar e estabilizar nanopartículas magnéticas, tendo em vista o estudo do seu potencial em futuras aplicações de teragnóstico. Como já foi referido, este conceito quando aplicado no combate do cancro, traduz-se em métodos ou sistemas capazes de intervir tanto no diagnóstico da doença como no seu tratamento. As aplicações especificamente estudadas foram: o comportamento como agente de contraste na monitorização da imagem por RMN e a capacidade de aquecimento das mesmas para hipertermia magnética.

Numa primeira fase foi otimizado o processo de síntese das NPs de óxidos de ferro por precipitação química, de forma a obter partículas com as menores dimensões e dispersão possíveis, e com uma configuração estrutural o mais semelhante ao da magnetite. Posteriormente foi realizada o revestimento destas NPs, inicialmente só com DMSA e mais tarde também com lisina, com o objetivo de aumentar a sua estabilidade, evitando a formação de grandes aglomerados, bem como permitir que esta preserve, as suas características e propriedades. Em simultâneo foram realizados um conjunto de técnicas de caracterização, para inferir sobre as alterações provocadas pela adição destas entidades. Por fim, com o intuito de testar a aplicabilidade das NPs sintetizadas, foram medidos os tempos relaxação das moléculas de água quando em contacto com estas, adquiridas imagens por RMN e realizados ensaios de hipertermia magnética e de viabilidade celular.

Relativamente ao primeiro conjunto de partículas, foi comprovado através dos ensaios de DLS, que a 50°C eram produzidas as NPs com dimensões e dispersão menores, tendo sido adotada esta temperatura para sínteses subsequentes. Estas partículas foram ainda avaliadas por DRX, tendo-se concluído que independentemente da temperatura de síntese, todas as amostras eram maioritariamente constituídas por magnetite. Quanto às NPs@DMSA, foi possível confirmar a conjugação do revestimento à superfície das NPs, através da técnica de FTIR. Os resultados de DLS revelaram que com o aumento do tempo de permanência em ultrassons (de 2h para 3h), se obtinham soluções de NPs@DMSA mais monodispersas e com menores diâmetros hidrodinâmicos, tendo-se obtido para os

menores diâmetros cerca de 110 nm. Os padrões de DRX, serviram para demonstrar que a estrutura cristalina não se alterou com o revestimento, bem como para calcular o tamanho médio de cristalites, que rondou os 10 nm. Estas dimensões mostraram-se coerentes com os tamanhos observados por TEM, de cerca de 12 nm. O comportamento superparamagnético destas partículas foi comprovado pelos ensaios de magnetização, com um valor de saturação de 50 emu/g. Tendo como base estas partículas, foi adicionado o aminoácido lisina à sua superfície, ficando confirmado esta conjugação através da técnica de FTIR. Os diâmetros hidrodinâmicos das NPs@DMA@Lys, avaliados por DLS, mostram-se ligeiramente superiores aos das NPs@DMSA, com valores próximos 145 nm, bem como um índice de polidispersabilidade inferior.

No que diz respeito aos ensaios de hipertermia magnética, numa primeira análise foi confirmado que, para os dois grupos de partículas, quando existia maior liberdade de movimento estas provocavam uma maior libertação de calor. Para além disso o aumento da concentração de Fe/NPs, em qualquer um dos meios, traduziu-se num maior aquecimento, sendo que em água esta progressão foi idêntica para ambas as amostras, e em ágar 0,5% as amostras de NPs@DMSA@Lys foram as que apresentaram maior progressão. Neste meio, foi ainda possível evidenciar que, fixando determinada concentração, estas últimas partículas apresentavam sempre incrementos de temperatura superiores quando comparadas com amostras sem a lisina. Estas evidências, juntamente com a análise dos valores de SAR, permitiram sugerir que o aquecimento desencadeado pelas NPs@DMSA@Lys depende menos da relaxação de Brown do que no caso das NPs@DMSA. Deste modo é expectável que quando aplicadas *in vivo*, as primeiras sejam mais eficientes quando absorvidas por células tumorais, necessitando de menores quantidades de partículas para atingir temperaturas críticas.

Estes dois grupos de partículas foram ainda sujeitos, a testes de relaxividade, numa fase mais inicial, sendo que posteriormente, e com o objetivo de confirmar as hipóteses apresentadas na primeira técnica, foram realizados ensaios de imagem por RMN. Nos primeiros, foi registado que, para ambas as partículas, T_2 foi mais fortemente reduzido do que T_1 , sugerindo desde logo um comportamento semelhante a um contraste negativo. Mais tarde a evidencia de elevadas razões de $r_2/r_1 - 171$ para as NPs@DMSA@Lys e 232 para as NPs@DMSA -, bem como da diminuição do tom de cinzento com o aumento da concentração de Fe/NPs nos ensaios de imagem, vieram reforçar esta hipótese. Os tempos de relaxação, juntamente com a análise das taxas de relaxação longitudinais e transversais, permitiram verificar que as diferentes partículas, apresentavam comportamentos distintos, em função da concentração de Fe/NPs presentes na amostra. Relativamente às concentrações, foram identificadas 3 situações distintas quando comparadas as capacidades de reduzir os tempos de relaxação para os dois tipos de nanopartículas – NPs@DMSA reduzem mais que NPs@DMSA@Lys, reduzem de igual forma e NPs@DMSA@Lys reduzem mais que NPs@DMSA – com o aumento da concentração de Fe/NPs.

Nos ensaios de imagem, foi realizada uma análise quantitativa dos tons de cinzento, de imagens referentes aos dois grupos de NPs, tendo-se constatado que a 0,5 mM as NPs@DMSA foram as que mais reduziram o sinal e que a 1,5 mM são as funcionalizadas com lisina. Desta evidência, surgiu a hipótese de que para concentrações entre estes valores, os dois compostos apresentariam capacidades semelhantes de poder gerar contraste em imagens ponderadas em T_1 . Quando comparadas as relaxividades r_1 e r_2 para os dois compostos, evidenciou-se um aumento destes dois valores das NPs@DMSA para as NPs@DMSA@Lys. Este aumento foi mais significativo no caso da relaxividade longitudinal, tendo sido sugerido a hipótese de a adição do aminoácido, aumentar a permeabilidade às moléculas de água do composto, bem como de criar mais interações com as mesmas através de grupos lábeis à superfície do revestimento, o que iria aumentar o tempo de residência das moléculas de água junto às NPs e consequentemente reflectir-se no valor de r_1 .

Os ensaios de citotoxicidade permitiram verificar que, no caso das NPs@DMSA, valores inferiores a 125 $\mu\text{g/mL}$ não apresentam qualquer tipo de toxicidade, sendo que até 500 $\mu\text{g/mL}$ estas são apenas moderadamente citotóxicas. Relativamente ao composto com o aminoácido, não foi possível tirar conclusões quanto à sua toxicidade, devido à ocorrência de uma contaminação, sendo este um ponto que deve ser futuramente investigado e discutido. No entanto, devido à ausência de evidências de toxicidade, apresentar benefícios no combate de diversas patologias, bem como o facto de ser interveniente em diversas funções no nosso organismo, é expectável que a adição deste aminoácido à superfície das NPs@DMSA, para além de não aumentar a sua toxicidade possa até reduzi-la.

Fazendo um cruzamento dos resultados referidos, é bastante perceptível que as NPs@DMSA@Lys se destacam positivamente relativamente às NPs@DMSA. De facto, para além de serem mais eficientes quando se trata de libertar calor em condições que simularam a fixação em tecidos tumorais, são ainda capazes de gerar contraste em imagens de RMN ponderadas em T_2 de forma semelhante às NPs@DMSA, e potencialmente em T_1 para, concentrações iguais ou superiores a 1,5 mM. Tal como as NPs@DMSA, apresentam uma elevada razão r_2/r_1 , que embora calculadas tendo como referência amostras com concentrações inferiores às estudadas em hipertermia e nos ensaios de citotoxicidade, demonstraram uma boa capacidade de gerar contraste com um comportamento idêntico a um agente de contraste negativo, pelo que será expectável que para concentrações superiores também a tenham. Os elevados valores de SAR obtidos, que se traduziram em aquecimentos que variaram entre 2,65°C e 8,45°C, demonstraram que é possível através destas partículas alcançar temperaturas capazes de degradar as células tumorais, para concentrações superiores ou iguais a 0,5 mg/mL. Estes resultados, aliados a uma perspetiva otimista quanto à toxicidade destas NPs, bem como de o seu comportamento como agente de contraste negativo, não decair para concentrações superiores às estudadas fazem com

que as NPs@DMSA@Lys para concentrações de 0,5 mg/mL sejam bons candidatos para a aplicação em simultâneo destas vertentes.

Assim sendo, o trabalho desenvolvido mostrou ser inovador quanto ao revestimento das NPs de magnetite escolhido, bem como pela polivalência demonstrada pelo composto sintetizado. Para além disso, considero que abriu grandes oportunidades de estudo para futuros projetos, uma vez que o novo composto sintetizado, apresenta grande potencialidade para ser integrado como um componente importante no teragnóstico do cancro.

5.2 PERSPETIVAS FUTURAS

O presente projeto de investigação mostrou uma grande versatilidade das NPs@DMSA@Lys, uma vez que estas mostraram grande potencialidade nas duas vertentes do teragnóstico do cancro – diagnóstico e tratamento. No entanto, e visto que ainda é um composto recente, torna-se de extrema importância a realização de um vasto conjunto de estudos complementares, para que estas possam realmente ser integradas em tais aplicações.

Tendo em consideração os resultados de relaxometria e de IRMN, seria bastante interessante realizar o mesmo estudo para um leque de concentrações mais restrito, especificamente para valores compreendidos entre 0,5 e 1,5 mM. O objetivo passaria por conseguir estimar, de forma mais detalhada, o comportamento destes dois compostos, na zona indicada como de alteração do composto com maior capacidade de gerar contraste, bem como calcular a que concentração é que os dois apresentam comportamentos semelhantes. Por outro lado, ampliar as concentrações para valores próximos dos utilizados em hipertermia magnética, bem como simular fluídos/tecidos corporais em ensaios de relaxometria e de imagem, seria uma forma de obter resultados muito mais coesos.

Outra questão que se espera ver resolvida, e que é de extrema importância, rege-se aos ensaios de citotoxicidade com as NPs funcionalizadas com a lisina. Sem a confirmação experimental desta questão, não se espera que a comunidade científica aprecie os restantes trabalhos realizados com este composto. Nesta etapa seria também muito interessante, realizar ensaios de viabilidade celular, em tecidos saudáveis e tumorais, quando simuladas as condições de hipertermia magnética.

Em jeito de conclusão, considero que o presente projeto, criou várias “janelas” de oportunidades para futuras investigações, esperando que as conclusões e reflexões apresentadas, venham a ter contributo para estas mesmas

REFERÊNCIAS

- [1] American Cancer Society, "Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition.," *Am. Cancer Soc.*, no. 800, pp. 1–64, 2015.
- [2] A. Araújo *et al.*, "Custo do tratamento do cancro em Portugal," *Acta Med. Port.*, vol. 22, no. 5, pp. 525–536, 2009.
- [3] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012," *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, 2013.
- [4] International Agency for Research on Cancer, "Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012," 2012. [Online]. Available: globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx. [Accessed: 10-Jan-2017].
- [5] G. C. Pereira, "Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética," Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [6] International Organization for Standardization, "Nanotechnologies - Vocabulary," 2015. [Online]. Available: www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en. [Accessed: 20-Jan-2017].
- [7] C. Europeia, "RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial," *JOUE*, no. 2005, pp. 38–40, 2011.
- [8] J. Lodhia, G. Mandarano, N. J. Ferris, P. Eu, and S. F. Cowell, "Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI," *Biomed. Imaging Interv. J.*, vol. 6, pp. 1–11, 2010.
- [9] S. P. Gubin, "Magnetic Oxides," in *Magnetic Nanoparticles*, Wiley-vch, 2009, pp. 1–444.
- [10] C. Sun, J. S. H. Lee, and M. Zhang, "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1252–1265, 2008.
- [11] L. C. a Oliveira, "Óxidos de ferro e suas aplicações em processos," *Quim. Nova*, vol. 36, no. 1, pp. 123–130, 2013.
- [12] R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses*, Wiley-VCH. 2003.
- [13] Pedro Manuel Abreu Martins, "Produção e caracterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica," Universidade do Minho, 2011.
- [14] M. E. Evans and F. Heller, *Environmental magnetism: principles and applications of enviromagnetics*. Amsterdam; Boston: Academic Press, 2003.
- [15] V. Iacovacci, G. Lucarini, L. Ricotti, and A. Mencias, "Magnetic Field-Based Technologies for Lab-on-a-Chip Applications," in *Lab-on-a-Chip Fabrication and Application*, 2016, pp. 1–56.

- [16] Y. A., "Aplicação de nanotecnologia no meio ambiente: Biossorvente magnético na remoção de urânio," Universidade de São Paulo, 2009.
- [17] S. Chikazumi, *Physics of Ferromagnetism*, Second edi., vol. 1. Oxford university press, 1997.
- [18] M. a. Willard, L. K. Kurihara, E. E. Carpenter, S. Calvin, and V. G. Harris, "Chemically prepared magnetic nanoparticles," *Int. Mater. Rev.*, vol. 49, no. 3, pp. 125–170, 2004.
- [19] B. Cullity and C. Graham, *Introduction to Magnetic Materials*, Second. Wiley, 2009.
- [20] J. P. Snneckker, "Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos," *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 22, no. 3, pp. 396–405, 2000.
- [21] A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna, and T. Pellegrino, "From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications," *Pharmacol. Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 126–143, 2010.
- [22] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, 2005.
- [23] M. M. Lin, D. K. Kim, A. J. El Haj, and J. Dobson, "Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications," *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 7, no. 4, pp. 298–305, 2008.
- [24] S. Laurent *et al.*, "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, 2008.
- [25] R. W. Hadjipanayis, G. C.; Siegel, *Nanophase materials : synthesis, properties, applications*. London: Academic, Kluwer, 1994.
- [26] J. Sun *et al.*, "Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles," *J. Biomed. Mater. Res. part A*, pp. 333–341, 2006.
- [27] P. I P Soares *et al.*, "Thermal and magnetic properties of iron oxide colloids: influence of surfactants," *Nanotechnology*, vol. 26, no. 42, p. 425704, 2015.
- [28] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W.-S. Kim, "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, no. 2, p. 23501, 2015.
- [29] P. I. P. Soares *et al.*, "Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 383, pp. 240–247, 2016.
- [30] K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, and R. Zboril, "Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1162–1176, 2015.
- [31] Y.-Q. Zhang *et al.*, "Toxicity of dimercaptosuccinate-coated and un-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles towards aquatic organisms," *Environ. Sci. Nano*, vol. 3, no. 4, pp. 754–767, 2016.
- [32] A. Ruiz, P. C. Morais, R. Bentes de Azevedo, Z. G. M. Lacava, A. Villanueva, and M. del Puerto Morales, "Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 16, no. 11, 2014.
- [33] C. Blanco-Andujar *et al.*, "Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic

- hyperthermia," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 14, pp. 1889–1910, 2016.
- [34] M. Branca *et al.*, "Towards MRI T2 contrast agents of increased efficiency," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 377, pp. 348–353, 2015.
- [35] A. Ebrahiminezhad, Y. Ghasemi, S. Rasoul-Amini, J. Barar, and S. Davaran, "Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONs)," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 33, no. 12, pp. 3957–3962, 2012.
- [36] X. Liang, X. Jia, L. Cao, J. Sun, and Y. Yang, "Microemulsion Synthesis and Characterization of Nano-Fe₃O₄ Particles and Fe₃O₄ Nanocrystalline," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1043–1049, 2010.
- [37] L. A. Miller, L. Patric, K. R. McCormic, N. P. Friel, and T. L. Chappell, "L-Lysine," *Altern. Med. Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 169–172, 2007.
- [38] J. J. DiGiovanna and H. Blank, "Failure of Lysine in frequently recurrent herpes simplex infection," *Arch. Dermatol.*, vol. 120, no. 1, pp. 48–51, 1984.
- [39] S. D. Ehrlich, "Lysine," *University of Meriland - Medical center*, 2015. [Online]. Available: <http://www.umm.edu/health/medical/altmed/supplement/lysine>. [Accessed: 01-Jan-2017].
- [40] L. Pauling, "Case Report : Lysine / Ascorbate-Related Amelioration of Angina Pectoris," *J. Orthomol. Med.*, no. March, pp. 144–146, 1991.
- [41] C. Wass *et al.*, "L-lysine as adjunctive treatment in patients with schizophrenia: a single-blinded, randomized, cross-over pilot study," *BMC Med.*, vol. 9, no. 1, p. 40, 2011.
- [42] N. Ahmed, H. Fessi, and A. Elaissari, "Theranostic applications of nanoparticles in cancer," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 17–18, pp. 928–934, 2012.
- [43] A. Mazzola, "Princípios Físicos da RM," *Rev. Bras. Física Médica*, vol. 3, pp. 117–129, 2009.
- [44] A. Jordan, P. Wust, H. Fähhlin, W. John, A. Hinz, and R. Felix, "Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia," *Int. J. Hyperth.*, vol. 9, no. 1, pp. 51–68, 1993.
- [45] A. Ito *et al.*, "Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia," *Cancer Lett.*, vol. 212, no. 2, pp. 167–175, 2004.
- [46] K. Luzyanin and M. Abrantes, "Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imaginologia Médica," *Química, Bol. da Soc. Port. Química*, vol. 117, no. 2, pp. 25–30, 2010.
- [47] H. H. Mitchell, T. S. Hamilton, F. R. Steggerda, and H. W. Bean, "The chemical composition of the adult human body and its bearing on the biochemistry of growth," *J. Biol. Chem.*, pp. 625–637, 1945.
- [48] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Krane, *Physics*, 4th editio. John Willey & Sons, 1992.
- [49] D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. G. And, and M. R. Prince, *MRI: From Picture to Proton*, Second. 2006.
- [50] K. S. Krane, *Introductory Nuclear Physics*. New York: John Willey & Sons, 1988.
- [51] U. of Liverpool, "Part 2 : Two Examples of the Boltzmann Distribution," *Stat. Phys.*, no. 3, pp. 1–43.
- [52] E. Toth, L. Helm, and A. Merbach, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic*

- Resonance Imaging*. United Kingdom, 2013.
- [53] Z. R. Stephen, F. M. Kievit, and M. Zhang, "Magnetite nanoparticles for medical MR imaging," *Mater. Today*, vol. 14, no. 7–8, pp. 330–338, 2011.
 - [54] S. H. Lee, B. H. Kim, H. Bin Na, and T. Hyeon, "Paramagnetic inorganic nanoparticles as T1 MRI contrast agents," *Wiley Period. Inc*, vol. 6, no. 2, pp. 196–209, 2014.
 - [55] J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, and M. A. Busquets, "Nanoparticles in magnetic resonance imaging: From simple to dual contrast agents," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 1727–1741, 2015.
 - [56] Magnetic Resonance - Technology Information Portal, "MRI Contrast Agents." [Online]. Available: <http://www.mr-tip.com/serv1.php?type=coa>. [Accessed: 10-Jul-2017].
 - [57] K. Cristina, D. Souza, N. Della, and S. Mohallem, "Quim. Nova," vol. 34, no. 10, pp. 1692–1703, 2011.
 - [58] J. van der Zee, "Heating the patient: A promising approach?," *Ann. Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1173–1184, 2002.
 - [59] J. Overgaard, "Hyperthermic oncology 1984," *Taylor Fr.*, vol. 2, pp. 3–8, 1985.
 - [60] B. N. G. S. K. Jones, K. F. Rutherford, A. J. Ruys, "Microparticles for selectively targeted hyperthermia," *US*, 2006.
 - [61] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, J. S. K, and J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, pp. R167–R181, 2003.
 - [62] T. Atsumi, B. Jeyadevan, Y. Sato, and K. Tohji, "Heating efficiency of magnetite particles exposed to AC magnetic field," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 310, no. 2 SUPPL. PART 3, pp. 2841–2843, 2007.
 - [63] D. H. Kim *et al.*, "Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 6S1, pp. 242–246, 2006.
 - [64] R. R. Shah, T. P. Davis, A. L. Glover, D. E. Nikles, and C. S. Brazel, "Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 387, pp. 96–106, 2015.
 - [65] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, and C. B. Taylor, "Selective Inductive Heating of Lymph Nodes," *Ann. Surg.*, vol. 146, no. 4, pp. 596–606, 1957.
 - [66] A. Jordan *et al.*, "Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 194, no. 1, pp. 185–196, 1999.
 - [67] D. C.F. Chan, D. B. Kirpotin, and P. A. Bunn Jr., "Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 122, no. 1–3, pp. 374–378, 1993.
 - [68] M. Benz, "Superparamagnetism : Theory and Applications," *Discuss. Two Pap. Magn. Nanoparticles*, pp. 1–27, 2012.
 - [69] G. Gnanaprakash, J. Philip, T. Jayakumar, and B. Raj, "Effect of digestion time and alkali addition rate on physical properties of magnetite nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 28, pp. 7978–7986, 2007.

- [70] M. Talelli *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: Toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery," *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 2060–2067, 2009.
- [71] N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, and A. Bee, "Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 194, no. 2, pp. 427–433, 1997.
- [72] H. Xie *et al.*, "Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo," *Biomaterials*, vol. 32, no. 2, pp. 495–502, 2011.
- [73] M. F. P. Amaro, "Development of a theranostic system for central nervous system based on superparamagnetic nanoparticles," FCT UNL, 2016.
- [74] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third Edit. London: Elsevier, 2013.
- [75] M. Instruments, "Dynamic light scattering," pp. 1–6, 2011.
- [76] Malvern Instruments, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes," pp. 1–8, 2000.
- [77] M. Soleymani and M. Edrissi, "Synthesis of Bilayer Surfactant Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application for Magnetic Fluid Hyperthermia," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 2691, no. September, 2015.
- [78] P. I. P. Soares *et al.*, "Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 419, pp. 46–51, 2014.
- [79] S. Palma, M. Marciello, A. Carvalho, S. Veintemillas-Verdaguer, M. del P. Morales, and A. C. A. Roque, "Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 437, pp. 147–155, 2015.
- [80] S. Zhang *et al.*, "The effect of iron oxide magnetic nanoparticles on smooth muscle cells," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 70–77, 2009.
- [81] S. I. C. J. Palma, "Engineered MRI nanoprobe based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles," Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [82] P. Caravan, C. T. Farrar, L. Frullano, and R. Uppal, "Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 4, no. 2, pp. 89–100, 2009.
- [83] A. Roch, F. Moyné, R. N. Muller, and P. Gillis, "Water Magnetic Relaxation in Superparamagnetic Colloid Suspensions : the Effect of Agglomeration," *Kluwer Acad. Publ.*, pp. 383–392, 2002.
- [84] M. Galli *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized by peptide nucleic acids," *RSC Adv.*, vol. 7, pp. 15500–15512, 2017.
- [85] T. Bulletin, "CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay," *Promega Corp.*, pp. 1–15, 2016.
- [86] S. N. Deshpande and D. G. Kadam, "Effect of annealing on structural and magnetic properties of iron oxide nanoparticles," *DAV Int. J. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 61–65, 2013.
- [87] G. Klug *et al.*, "Intracellular and extracellular T1 and T2 relaxivities of magneto-optical nanoparticles at experimental high fields," *Magn. Reson. Med.*, vol. 64, no. 6, pp. 1607–1615, 2010.
- [88] B. Basly *et al.*, "Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI," *Chem Commun*, vol. 46, no. 6, pp. 985–7, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 - INCIDÊNCIA/MORTALIDADE DO CANCRO

Estas estatísticas foram realizadas pela *International Agency for Research on Cancer*, no âmbito do projeto GLOBOCAN 2012. Neste estudo foi analisada a incidência, mortalidade e prevalência de diversos tipos de cancro, em função de variados parâmetros como o país, sexo e idade. Contou com a participação de mais de 180 países em todo o mundo. Na figura 7.1 está representada a incidência e mortalidade do cancro a nível mundial e em determinadas zonas continentais.

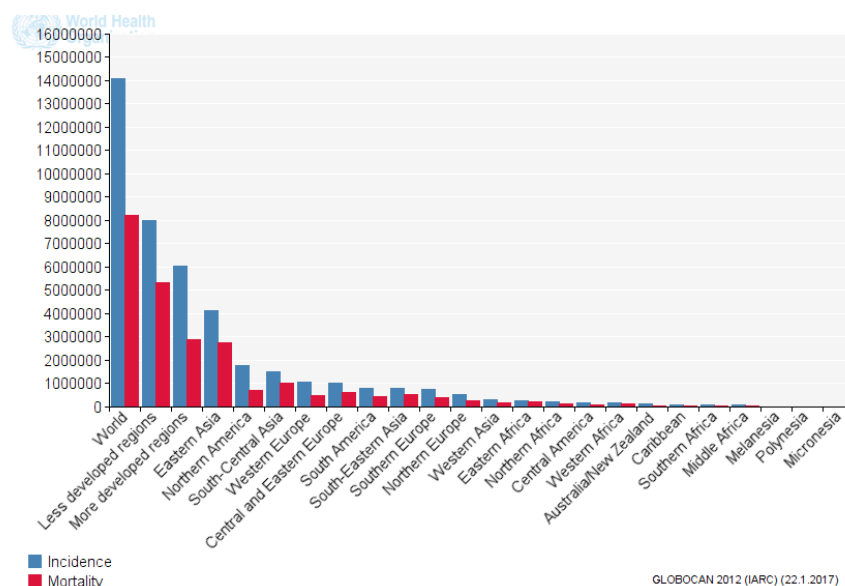


Figura 7.1 – Incidência e mortalidade do cancro a nível mundial e por zonas continentais. As barras a azul representam a incidência, e as barras a vermelho a mortalidade. Retirado de [4].

ANEXO 2 -ESPETRO DE DRX DA MAGNETITE/MAGMITE

Embora numa primeira abordagem, os espectros da magnetite e da magmite sejam muito similares, estes apresentam ligeiras diferenças. Na tabela 7.1 podemos ver os picos característicos de cada um destes, com a respetiva intensidade relativa.

| MAGNETITE | MAGMITE |
|-----------|---------|
|-----------|---------|

| 2 θ (graus) | Intensidade (%) | 2 θ (graus) | Intensidade (%) |
|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| 30,095 | 30 | 30,241 | 35 |
| 35,423 | 100 | 35,631 | 100 |
| 43,053 | 20 | 43,285 | 16 |
| 53,392 | 10 | 53,734 | 10 |
| 56,944 | 30 | 56,273 | 24 |
| 62,516 | 40 | 62,927 | 34 |

Tabela 7.1 - Picos característicos e respectivas intensidades (%), dos espectros de difração de raios-X da magnetite e da magmíte. Adaptado de [86].

ANEXO 3 - RELAXIVIDADES DE ALGUMAS IONPs

Na tabela 7.2 estão representadas as relaxividades longitudinais (r_1) e transversais (r_2), bem como as respectivas razões r_2/r_1 , de diversas IONPs quando submetidas a um campo magnético de 7 T e a 37°C. Todos os IONPs selecionados apresentam um comportamento semelhante a um AC negativo, sendo o Endorem™, revestido com Dextran T10, um exemplo de um já comercializado.

Tabela 7.2 – Relaxividades longitudinais e transversais de algumas nanopartículas de óxidos de ferro (IONPs) quando submetidos a um campo magnético de 7 T, bem como as respectivas razões r_1/r_2 .

| Agente de contraste | r_1 (s ⁻¹ mM ⁻¹) | | r_2 (s ⁻¹ mM ⁻¹) | | r_2/r_1 | | Referência |
|---------------------|---|------------|---|------------|------------|------------|------------|
| | Em solução | Em células | Em solução | Em células | Em solução | Em células | |
| Rh-AMNP | 4,78 | 0,21 | 379 | 56 | 79,29 | 266,67 | [87] |
| AMI-25 | 1,98 | 0,57 | 148 | 72 | 74,75 | 126,32 | |
| VSOP C-200 | 4,09 | 0,25 | 79 | 32 | 19,32 | 128,00 | |
| Endorem@DextranT10 | 2,2 | - | 182 | - | 82,7 | - | [88] |

ANEXO 4 - VALORES DE SAR DE ALGUMAS IONPs

Na tabela 7.3, estão representados os valores das taxas de absorção específica (SAR) de diversas nanopartículas de óxidos de ferro (IONPs), retirados da literatura, em função do tipo de revestimento utilizado, do diâmetro do núcleo magnético e da frequência aplicada nos ensaios de hipertermia magnética. Os valores registados são de amostras de magnetite ou magmíte, sendo o solvente utilizado nas amostras água.

Tabela 7.3 – Valores de taxa de absorção específica de algumas IONPs, com revestimentos e diâmetros de núcleo diferentes.

| Tipo de óxido ferro | Revestimento | D _{TEM} (nm) | Frequência (kHz) | SAR (W/g) | Referência |
|----------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|------------|------------|
| Fe ₃ O ₄ | Nuas | 8 | 300 | 97 | [33] |
| γ-Fe ₂ O ₃ | Dextran | 3 | 500 | 106 | |
| γ-Fe ₂ O ₃ | Dextran | 5 | 500 | 524 | |
| Fe ₃ O ₄ | Dextran | 3,3 | 520 | 120 | [66] |
| Fe ₃ O ₄ | DMSA | 17 | 183 | 65 | [84] |